

**Zur Kenntniss der
Monaminoxydase**

Elisabeth Eckert-Husemann
geb. Husemann

1962



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DEM KLINISCH-CHEMISCHEN INSTITUT AN DER
CHIRURGISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Vorstand: Professor Dr. Dr. E. Werle

Zur Kenntnis der Monaminoxidase

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Elisabeth Eckert-Husemann

geb. Husemann

aus Bielefeld

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

Professor Dr. Dr. E. WERLE

Dekan:

Professor Dr. A. HERRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.1962



MEINEM VATER IN DANKBARKEIT
UND DEM ANDENKEN MEINER MUTTER
GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG

Begriffsklärung
Zielsetzung

B. METHODIK

- 1) Gewinnung und Reinigung der Fermentpräparate
- 2) Aktivitätsbestimmung mit Angabe der gewählten Standard-Methode
Festlegung der Versuchsdauer
- 3) Gegenüberstellung von
Sauerstoff-Verbrauch und Ammoniak-Entwicklung während der Monamin-Monamin-Oxydase-Reaktion
- 4) Enzymkonzentration
- 5) Substratkonzentration
- 6) Festlegung des Begriffes "spezifische Aktivität"

C. VERSUCHE

- 1) Zur Frage der Organ- und Artspezifität und ihrer funktionellen Bedeutung
- 2) zur Frage der Fermentaktivierung durch eine körpereigene Substanz, und die Wirkung von Pyridoxalphosphat auf die Monaminoxidase-Aktivität verschiedener Organe
- 3) Vergleich der Monaminoxidase-Aktivität bei aromatischen mono-, dihydroxylierten und nicht hydroxylierten Substraten
 - a) bei der MO aus Leber- und Nieren-Gewebe
 - b) bei der MO aus zentralem Nervengewebe und Uterus
 - c) bei der MO aus Placenta-Gewebe
- 4) Die gegenseitige Beeinflussung von Diamino- und Monamino-Oxydase
- 5) Die Auswirkung psychisch wirksamer Substanzen auf die MO-Aktivität in vitro und in vivo unter Beachtung der Organspezifität
 - a) in-vivo- und in-vitro-Versuche mit Lysergsäurediäthylamid bei der Ratte
 - b) entsprechende in-vitro-Versuche mit Schweineorganen
- 6) Zur Frage der Löslichkeit der Monaminoxidase

D. DISKUSSION

E. ZUSAMMENFASSUNG

Literaturverzeichnis

A. EINLEITUNG

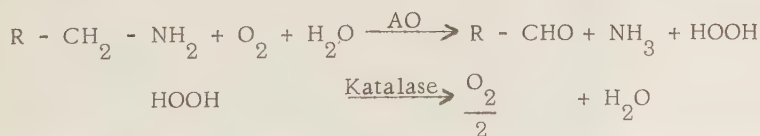
Ein Hauptcharakteristikum der lebenden Substanz ist ihr ständiger Umwandlungsprozess nach einem vorgesetzten Plan. Dabei wird an einem ökonomischen Prinzip strenger Arbeitsteilung festgehalten, das besonders bei den höher entwickelten Lebewesen erstaunlich kompliziert und zugleich exakt arbeitet. Bei diesen Wandlungsvorgängen spielen die Fermente als Biokatalysatoren eine ausserordentlich wichtige Rolle. Hier wiederum sind es die decarboxylierenden, transaminierenden, oxydativen und desaminierenden Vorgänge, die von besonderem Interesse sind.

Die Bildungsstätte der Fermente ist die Zelle. Mit der Weiterentwicklung der mikroskopischen Technik wurden bereits vor der Jahrhundertwende im Cytoplasma Formelemente verschiedener Grösse entdeckt, von denen R. ALTMANN einen Zusammenhang mit dem Zellstoffwechsel vermutete (1886). BENDA (3) wählte für diese Gebilde den treffenden Ausdruck Mitochondrien (1897). BATELLI und STERN erkannten, dass gewisse Oxydationsfermente an bestimmte unlösliche Strukturelemente im Cytoplasma gebunden sind (1917); O. WARBURG (26) gelang der Beweis, dass der Hauptteil der Zellatmung mit diesen "festen" Teilchen im Zusammenhang steht, und D. E. GREEN (10) konnte endgültig nachweisen, dass die Mitochondrien die alleinigen Träger der gesamten Zellatmung sind (1951).

Der Wirkungsmechanismus dieser Stoffwechselvorgänge wurde in den letzten Jahrzehnten mit den verschiedensten Mitteln erforscht. Wertvolle Kenntnisse über die Vorgänge bei den Aminoxydasen verdanken wir den Forschungsarbeiten der Laboratorien:

BLASCHKO, Oxford; ZELLER, Chicago und WERLE, München.

Bei den Aminoxydasen handelt es sich um Fermente, die eine Reihe von biogenen Aminen oxydativ desaminieren. Schematisch kann der Reaktionsmechanismus wie folgt dargestellt werden:



Die Aktivität der Aminoxydasen lässt sich somit durch Messung des entstandenen Aldehyds, des gebildeten Ammoniaks bzw. des entsprechenden Amins; oder des verbrauchten Sauerstoffes bestimmen. Bei Substraten mit charakteristischen Absorptionsspektren kann u. U. die Veränderung der Absorptionsintensität als Mass für die Aminoxydaseaktivität dienen.

Eine Unterteilung in Diaminoxydasen - zu denen nach E. A. ZELLER auch Histaminasen zu rechnen sind (29) - und Monaminoxydasen resultierte zunächst aus einer unterschiedlichen Substratspezifität. Durch zahlreiche Forschungsarbeiten konnte aber gezeigt werden, dass sowohl Monamine wie Diamine von beiden Enzymgruppen angegriffen werden. Es besteht lediglich ein quantitativer Unterschied (30).

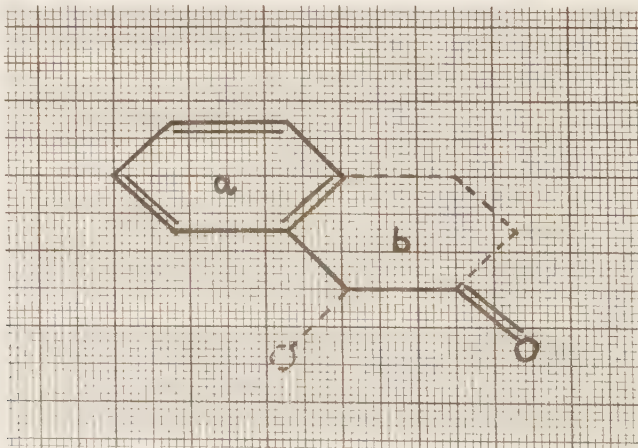
Trotzdem wurde weiterhin an dieser Unterteilung festgehalten. Wie W. P. BURKHARD u. Mitarb. erneut nachweisen konnten, besteht eine Heterogenität auch auf Grund eines verschiedenen Inhibitorspectrums sowohl in vivo wie in vitro (6). Allerdings scheinen sich die beiden Enzymgruppen weitgehend gegenseitig zu beeinflussen, so dass eine Grenze nicht immer scharf zu erkennen ist.

Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal besteht ausserdem darin, dass die DO löslich ist, während die MO, weil an die Mitochondrien gebunden, unlöslich ist.

E. A. ZELLER gewann durch zahlreiche Versuche mit verschiedenen Substraten und Inhibitoren die Überzeugung, dass die optimale Wirkung der MO an einen bestimmten komplementären Aufbau des Zentrums gebunden ist:

"aktives Zentrum" der Monaminoxydase

- a) primärer Teil
- b) sekundärer Teil



Wie aus der Zeichnung ersichtlich ist, wird bei diesem "aktiven Zentrum" zwischen einem aromatischen primären und einem aliphatischen sekundären Teil unterschieden. Zugleich wurde die Wichtigkeit des in α -Stellung zur Aminogruppe stehenden Wasserstoffes für die Bindung zwischen Substrat bzw. Hemmkörper und Enzym erkannt. Durch Methylierung in α -Stellung geht die Affinität zum Ferment verloren.

Die Enzymologie ist somit heute bestrebt, sich in die strukturelle, organische Chemie einzuordnen. Wir müssen auch in Betracht ziehen, dass die Chemie eigentlich nur ein Teilgebiet der Physik ist. In der Biochemie dürfen die physikalischen Gesetze nicht ausser Acht gelassen werden; denn Veränderungen der Oberflächenspannung, der Phasengrenzflächen-Energie, der Viskosität u.ä. spielen beim Stoffaustausch innerhalb der Zellen eine wichtige Rolle.

Das Interesse für die Funktion der Aminoxydasen wuchs in den letzten Jahren beachtlich, da eine gewisse Abhängigkeit des psychischen Verhaltens von dem harmonischen Zusammenspiel zwischen der Anlieferung von Aminen insbesondere von Serotonin durch die 5-Hydroxy-Tryptophan-Decarboxylase und dem Abbau der Amine durch die Aminoxydase besteht. Bereits 1953 stellte SCHAYER fest, dass die intensive Hemmwirkung von Isopropyl-Isonicotinsäure-Hydrazid gegenüber der MO zu akuten Psychosen führen kann (22). Seitdem wurden die Wirkungen von Substraten und von Hemmkörpern der Monaminoxydase in vitro und in vivo nach vielen Richtungen erforscht (4, 5, 17, 19, 23, 24).

Wenig Beachtung fanden dabei bisher

- 1) das Vorliegen einer Organ- und Artspezifität und ihre funktionelle Bedeutung;
- 2) die Möglichkeit der Fermentaktivierung durch eine körpereigene Substanz, und die Wirkung von Pyridoxalphosphat auf die Monaminoxydase-Aktivität verschiedener Organe;
- 3) die Beeinflussung der Monaminoxydase-Aktivität durch aromatische hydroxylierte und nichthydroxylierte Substrate;
- 4) die gegenseitige Beeinflussung von Diamino- und Monaminoxydase;
- 5) die Auswirkung psychisch wirksamer Substanzen auf die Monaminoxydase-Aktivität in vitro und in vivo unter Beachtung der Organspezifität.

Die vorliegende Arbeit befasst sich besonders mit diesen Fragen.

- 6) Das Problem der MO-Löslichkeit wurde erneut aufgegriffen.

B. METHODIK

1) GEWINNUNG UND REINIGUNG DER FERMENTPRÄPARATE

Die zu untersuchenden Organe wurden so frisch wie möglich bezogen, sauber präpariert und nach kurzem Einfrieren mit m/15 Phosphatpuffer p_H 7.4, nach Sörensen, in der Kälte homogenisiert. Aufbewahrung der nicht sofort geprüften Präparate erfolgte in der Kühltruhe bei -15°C ohne wesentlichen Aktivitätsverlust(11)

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch unerwünscht hohe Leerwerte, d.h. durch einen hohen unspezifischen Leer-Sauerstoff-Verbrauch, der besonders bei Leberhomogenaten auffiel, möglichst zu vermeiden, wurden die Homogenate in verschiedener Weise vorbehandelt:

Hundeleber wurde zunächst mit dem angegebenen Puffer im Verhältnis 1 : 2 homogenisiert. Die MO-Aktivität des Homogenats wurde bestimmt. Das Homogenat wurde dann bei $18\,000 \times g$ 30 Minuten in der Kühlzentrifuge zentrifugiert; nach Prüfung auf MO-Aktivität sowohl des Überstehenden wie des erhaltenen Rückstandes, der mit der äquivalenten Menge Phosphatpuffer aufgerührt wurde, wurden die erhaltenen beiden Fermentlösungen nochmals in der geschilderten Weise zentrifugiert und die resultierenden Überstände und Sedimente in entsprechender Weise der Aktivitätsbestimmung unterworfen. Die nachstehenden tabellarisch aufgeführten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die besten Werte durch zweimaliges Zentrifugieren erreicht wurden.

Schweineleber wurde der gleichen Behandlung unterworfen und zeigte ganz ähnliches Verhalten.

Anstatt des mehrfachen Zentrifugierens bei $18\,000 \times g$ 30 Minuten, konnten gleich gute Ergebnisse durch einmaliges Zentrifugieren in der Ultra-Kühlzentrifuge bei höherer Tourenzahl und längerer Dauer erreicht werden. Nach mehreren Vergleichsprüfungen wurden die bestmöglichen Werte bei $78\,400 \times g$, 60 Minuten, im Niederschlag erhalten.

Beim Durchtreiben der Leber durch den Fleischwolf und anschliessender mehrfacher Extraktion mit m/15 Phosphatpuffer p_H 7.4, zeigte das erhaltene Homogenat aus den verbleibenden Zellrückständen ebenfalls eine hohe Aktivität, die nicht durch Nebenwirkungen (hohe Leerwerte) ungünstig beeinflusst wurde. Ein ähnlich gutes Fermentpräparat konnte durch Aufarbeitung der Organe mit Sand hergestellt werden. Diese Methoden brachten aber gegenüber dem scharfen Zentrifugieren der mit dem Phywe-Homogenisator zerkleinerten Organe keinen Vorteil, waren vielmehr umständlicher und zeitraubender.

Für die nachfolgenden Versuche wurden deshalb die Enzympräparate in der zuerst geschilderten Weise hergestellt:

Homogenisieren der frisch bezogenen Präparate in der Kälte mit dem Phywe-Homogenisator, evtl. anschliessend scharfes Zentrifugieren 60 Minuten bei $78\,400 \times g$ in der SPINCO-Kühlzentrifuge.

Ausnahmen von dieser Gewinnungsmethode werden besonders gekennzeichnet.

TABELLE 1: Aktivität der beim fraktionierten Zentrifugieren von Hundeleberhomogenat erhaltenen MO - "Lösungen".

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	spezifische Aktivität: O ₂ -Verbrauch μ Mol/2
1. Homogenat (1 : 2)	82.8	0.155
2. Überstand des zentrifugierten Homogenats (1. Z.)	60.5	0.155
3. Rückstand des 1. Z. im Ausgangsvolumen Phosphatpuffer suspendiert	86.0	0.224
4. Rückstand d. 1. Z. mit Phosphatpuffer stärker verdünnt	40.0	0.312
5. Überstand d. zentrifugierten 2. Homogenats (R. -Std. v. 1. Z. = 2. Z.)	(klar)	keine messbare Aktivität
6. Rückstand d. 2. Z. im Ausgangsvolumen Phosphatpuffer suspendiert	40.0	0.580
7. Rückstand d. zentrifugierten 1. Überstandes (Ü. -Std. v. 1. Z.) im Ausgangsvolumen Ph. -Puffer suspendiert	5.0	1.595

2) AKTIVITÄTSBESTIMMUNG MIT ANGABE DER GEWÄHLTEN STANDARD-METHODE; FESTLEGUNG DER VERSUCHSDAUER

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde die Sauerstoffaufnahme mit Hilfe der Warburg-Apparatur manometrisch verfolgt.

Die Zusammenstellung der Ansätze, Vorinkubation, Begasung und Substratzugabe erfolgten im wesentlichen nach bereits gut ausgearbeiteten Vorschriften wie bei E. WERLE und E. HENNIG (27) ausführlich beschrieben.

a) Zusammenstellung der Ansätze: Zur Aktivitätsbestimmung wurden 0.5 ml des zu prüfenden Fermentpräparates in den Hauptraum eines Warburg-Gefäßes gegeben; bei der MO wurden KCN (Endkonzentration 1.5×10^{-3} m) und Semicar-

bazid (Endkonzentration 10^{-2} m) hinzugefügt; mit Phosphatpuffer wurde auf ein Volumen von 2,5 ml aufgefüllt.

Im Kipper befanden sich 0,5 ml Substratlösung. Die jeweils gewählte Endkonzentration im Reaktionsvolumen wird unter B 5 genau besprochen und festgelegt.

Die Zentralgefäße enthielten 0.25 ml 2.4×10^{-2} m KCN-Lösung in 10 %iger KOH, die in einem Filterpapierstreifen aufgenommen war.

Jede Aktivitätsbestimmung begleiteten zwei Blindproben, die Puffer statt des Substrates im Kipper enthielten.

b) Messung und Berechnung des Sauerstoffverbrauches: Die Ansätze wurden 10 Minuten lang mit Sauerstoff durchströmt und gleichzeitig bei 37°C in der Warburg-Apparatur vorinkubiert. Dann wurde durch Einkippen der Substratlösung in den Hauptraum die Reaktion eingeleitet und 2 Minuten später die erste Ablesung vorgenommen.

Im Gegensatz zu den Angaben bei E. HENNIG wurde bei unseren Versuchen im allgemeinen der Sauerstoff-Verbrauch 40 Minuten lang verfolgt. Warum diese Versuchsdauer gewählt wurde, wird nachstehend erläutert.

Die abgelesenen Werte wurden mit der jeweils zugehörigen Gefäßkonstante multipliziert, durch die die Gasvolumina auf Normalbedingungen korrigiert und die im Ansatz gelöste Gasmenge berücksichtigt werden (21).

$$\frac{V_{\text{Gas}} \times \frac{T_0}{T} + V_{\text{Fl.}} \times \alpha_{\text{O}_2}^{37^{\circ}}}{P_0} = k_{\text{O}_2}$$

V_{Gas} = Gasvolumen,

$V_{\text{Fl.}}$ = Flüssigkeitsvolumen

P_0 = Normaldruck (mm Wasser),

$\alpha_{\text{O}_2}^{37^{\circ}}$ = BUNSEN'scher Absorptionskoeffizient = 0.024.

Aus den Produkten wurde für jede Ablesungszeit das arithmetische Mittel für Haupt- und Leerwert genommen und ihre Differenz errechnet.

3) GEGENÜBERSTELLUNG VON SAUERSTOFF-VERBRAUCH UND AMMONIAK-ENTWICKLUNG WÄHREND DER MONAMIN - MONAMIN-OXYDASE-REAKTION

Der Messung des O_2 -Verbrauches in der Warburgapparatur wurde zum Vergleich die NH_3 -Entwicklung nach Conway gegenüber gestellt. Entsprechend unseren eigenen Beobachtungen berichten G.C. COTZIAS und J.J. GREENOUGH, dass die Aktivitätsangaben der Aminooxydasen allein auf Grund des O_2 -Verbrauches zu ungenau sind. Bei den einzelnen Substraten muss u. U. berücksichtigt werden, dass Sauerstoff nicht nur zur Oxydation der Aminogruppe sondern bei aromatischen

Aminen evtl. auch zur Oxydation von Hydroxylgruppen verbraucht wird. So lagen nach Angaben von COTZIAS und GREENOUGH die O_2 -Werte bei diesen Substraten zum Teil wesentlich höher als die entsprechenden NH_3 -Werte. Ausserdem war in den ersten Minuten die O_2 -Aufnahme im Vergleich zur NH_3 -Entwicklung relativ gering; mit zunehmender Reaktionszeit änderte sich das Verhältnis zu Gunsten des O_2 -Verbrauches (7).

Nach eigenen Beobachtungen war eine Versuchsdauer von 40 Minuten für die Gegenüberstellung der Werte besonders günstig. Es wurde also auch aus diesem Grund an der vorerwähnten Reaktionszeit festgehalten.

4) ENZYMKONZENTRATION

Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, verläuft beim "ungereinigten" Leber-Enzym die Sauerstoff-Aufnahme nicht linear mit der Zeit; der Kurvenverlauf wird besonders durch endogenen Sauerstoffverbrauch (hohe Leerwerte) ungünstig beeinflusst. Dieser Fehler lässt sich durch das erwähnte scharfe Zentrifugieren vollständig beseitigen. Aber sowohl die "ungereinigten" wie die "gereinigten" Enzyme zeigen eine nicht lineare Abhängigkeit von der Konzentration des Fermentes. Zwar bleibt das Kurvenbild beim Einsatz unterschiedlicher Enzymkonzentrationen im Charakter gleich; die Messungen ergeben aber in Übereinstimmung mit HENNIG (11) bei hohem Proteingehalt einen wesentlich geringeren Sauerstoff-Verbrauch pro mg Protein als bei stark verdünnten Enzympräparaten. Ausserdem ist die Summe der Aktivitäten von Überstand und Rückstand höher als die Aktivität des unzentrifugierten Homogenats. Dieser Unterschied wird wiederum bei Leber-Mitochondrien besonders deutlich.

Durch die nachstehenden Kurven, die aufgeführten Werte in Tabelle 1 und Vergleichszahlen nach E. WERLE und E. HENNIG können diese Tatsachen gut veranschaulicht werden.

Nach E. WERLE und E. HENNIG (27):

Schweineleber	Kontrollversuch spez. Aktivität	Versuch mit Saponin spez. Aktivität
Homogenat	1.93	2.01
Überstand	0.68	0.23
Niederschlag	3.35	3.87

(das Homogenat wurde 60 Min. bei 18 000 g zentrifugiert)

Auf Grund neuer elektronenmikroskopischer Feststellungen 8) ist es denkbar, dass durch das Zentrifugieren ein Teil der "Promitochondrien" aus ihrer Umhüllung befreit wird bzw. "Mitochondrien-Knospen" abgetrennt werden und so zusätzlich wirksam werden können. Die unterschiedlichen Werte sind bei Leber-Mitochondrien besonders gross, in Übereinstimmung damit ist die früher beobachtete "spontane

ABBILDUNG 1: MO-Aktivität bei Präparaten von Schweineleber:

- ▲— Homogenat (1 : 3)
- x— Rückstand des zentrifugierten Homogenats (18 000 x g 30 Minuten)
- Überstand des zentrifugierten Homogenats (18 000 x g 30 Minuten)

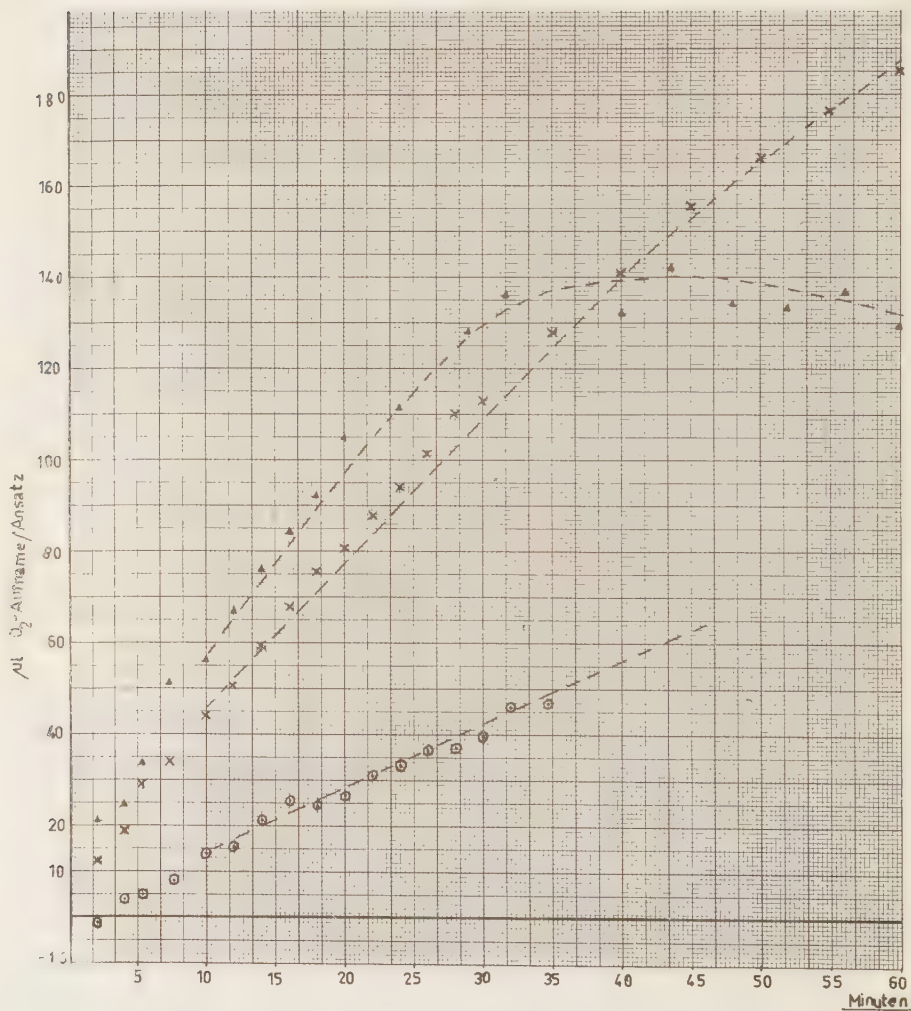
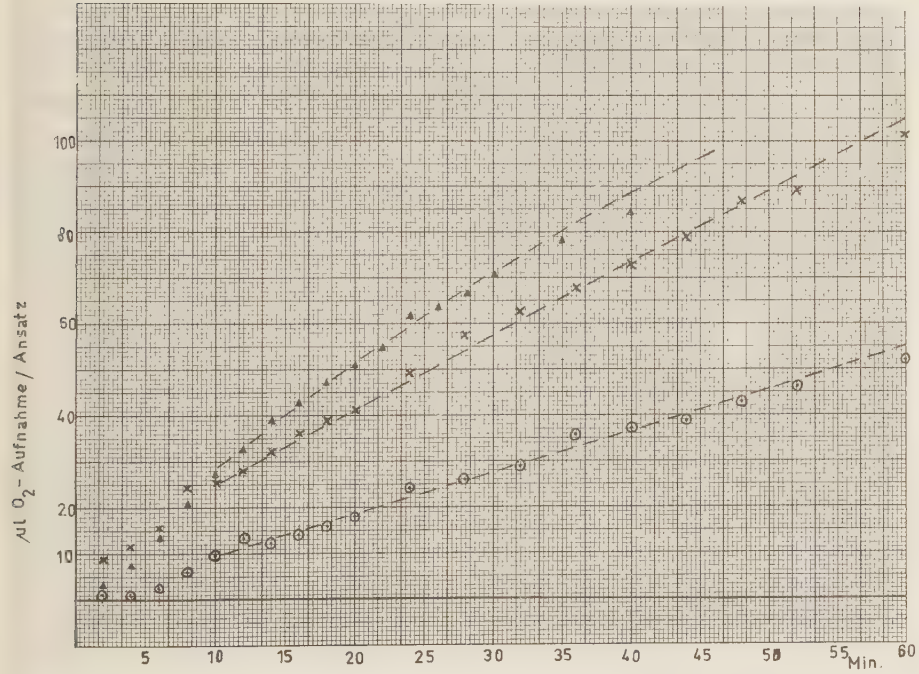


ABBILDUNG 2: MO-Aktivität bei Präparaten von Gl. submax. Mensch:

spezifische Aktivität:
 O_2 -Verbrauch μ Mol/2

—▲—	Homogenat (1 : 2)	0.122
—x—	Rückstand v. Zentr. (18 000 x g 30 Minuten)	0.111
—○—	Überstand v. Zentr. (18 000 x g 30 Minuten)	0.107



Löslichkeit" des Fermentes bei Leberpräparaten auffallend hoch (11). Diese Beobachtungen werden in der Diskussion eingehender besprochen.

Wir entschlossen uns, um Wertverschiebungen durch zu unterschiedliche Enzymkonzentrationen weitgehend zu vermeiden, nur eine geringe Fermentmenge (20 bis 50 mg Protein/ml) bei den weiteren Versuchen einzusetzen. Die Mitochondrien-Aufschwemmungen wurden bei den zu vergleichenden Ansätzen stets in der gleichen Weise hergestellt, auch die Verdünnung bezogen auf die Gewichtsmenge der zu untersuchenden Organe war entsprechend.

5) SUBSTRATKONZENTRATION

Bei allen fermentativen Reaktionen wird das Substrat erst im Ferment-Substrat-Komplex reaktionsfähig. Die Reaktionsgeschwindigkeit muss folglich der Konzentration des Komplexes proportional sein, die dabei asymptotisch ihrem Maximalwert zustrebt. Sollen Vergleichsmessungen zur Charakterisierung der Enzymaktivität angestellt werden, so muss die Substratkonzentration so hoch gewählt werden, dass das Ferment gesättigt ist.

Nach den Ausführungen von E. HENNIG wird diese Bedingung bei Tyramin und Tryptamin bei einer $5 \times 10^{-3} \text{m}$ Lösung erreicht (11). Bei unseren Messungen ergab sich, dass durch eine 10^{-2}m Endkonzentration eine weitere Aktivitätssteigerung um ca. 10 % bei den von uns gewählten Fermentkonzentrationen zu erzielen war. Bei den anschliessend durchgeführten Versuchen wurde deshalb diese höhere Substratkonzentration beibehalten. In Übereinstimmung damit stehen die üblichen Enzym-, Substrat-Konzentrationen. Auch bei der Bestimmung der Diaminoxidaseaktivität mit Cadaverin ist eine 10^{-2}m Lösung optimal (27, 31).

Im Verlauf der Reaktion kann die Geschwindigkeit des Umsatzes aus verschiedenen Gründen abnehmen. Ausser einer Abnahme an aktivem Enzym während der Inkubation durch partielle Denaturierung des Fermentes z.B. durch Abspaltung des Cofermentanteiles, kann es auch zur Anreicherung von kompetitiv hemmenden Reaktionsprodukten kommen, die bei reversiblen Reaktionen wie z.B. der Esterspaltung sogar zu einer Reaktionsumkehr Anlass geben können. Es kann sich ein Gleichgewicht einstellen, bei dem die Reaktionsgeschwindigkeiten in beiden Richtungen gleich gross sind.

Ausserdem vermag die Verarmung des Reaktionsansatzes an Substrat während des Versuches eine merkbare Verminderung der Reaktionsgeschwindigkeit zu verursachen; denn schon ein geringer Substratverbrauch bewirkt eine relativ grosse Änderung der Substratkonzentration.

Hier sei auch auf die sehr verwickelten Zusammenhänge, welche die Geschwindigkeit der Dopadecarboxylierung bestimmen, sowie auf die Verhältnisse bei der Diamin-Oxydasereaktion hingewiesen (1). Dabei spielt die Tatsache eine Rolle, dass das bei der Amin- Aminoxydase-Reaktion entstehende Hydroperoxyd das Enzym zu zerstören vermag, und zwar nach P. J. G. MANN nur in seiner reduzierten Form (20).

Gemäss den früheren Ausführungen wird ein Reaktionsabfall während des Versuches besonders beim Leberhomogenat sichtbar. Es ist denkbar, dass bei der spontan einsetzenden Reaktion im Überschuss Hydroperoxyd entsteht und eine Hemmung des Fermentsystems bewirkt; zugleich kommt es zur Substrat-Verarmung, so dass die geforderte Ferment-Substrat-Sättigung nicht mehr gegeben ist.

Bei Mangel an Gewebeskatalase im Verlauf der Reaktion müsste sich der Einfluss von Hydroperoxyd durch Katalase-Beimengung zum Versuchsansatz vermindern lassen, und ein gleichmässigerer Aktivitätsanstieg resultieren. Andererseits müsste auch eine erneute Substratzugabe nach Ablauf der intensiven Anfangsreaktion einen nochmaligen Reaktionsanstieg bewirken.

Beide Voraussagen liessen sich in parallellaufenden Kontrollversuchen einwandfrei bestätigen:

Beim "ungereinigten" Leberhomogenat trat entsprechend der Darstellung in Abb. 1 ein deutlicher Aktivitätsabfall nach 30 bis 40 Minuten ein, daraufhin wurde nochmals die gleiche Menge Substrat den Ansätzen zugefügt, und es resultierte ein erneuter Anstieg entsprechend der Anfangsaktivität. Bei den Parallel-Versuchen unter Zugabe von Katalase war die Aktivitätsminderung nur sehr gering, der Anstieg zeigte nach Einstellung des Systems in den ersten 10 Minuten einen weitgehend linearen Verlauf. Nach einer Versuchsdauer von 60 Minuten lag die "spezifische Aktivität" nur 8 % unter dem Wert bei zweimaliger Substratzugabe.

6) FESTLEGUNG DES BEGRIFFES "SPEZIFISCHE AKTIVITÄT"

Aus den erwähnten Gründen lassen sich die ersten 10 bzw. 12 Minuten für die exakte Bewertung der Enzymwirkung nicht verwerten. Als "spezifische Aktivität" wurden deshalb der zwischen 10 und 40 Minuten bzw. 12 und 42 Minuten registrierte Wert des O_2 -Verbrauches auf den Wert pro Stunde, pro mg Protein, umgerechnet und dem entsprechenden Wert der NH_3 -Entwicklung gegenüber gestellt.

Folglich gilt als Masseinheit:

"spezifische Aktivität"

= O_2 -Aufnahme μ Mol/2 in 60 Min./mg Protein und
 NH_3 -Entwicklung μ Mol in 60 Min./ mg Protein,
bei einer allgemeinen Versuchsdauer von 40 Minuten.

Die Proteinbestimmung der Fermentpräparate erfolgte nach der Biuretmethode(11), es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Dabei soll nicht unerwähnt bleiben, dass diesem Bezugsmass die gewünschte Exaktheit fehlt, da Protein-Gehalt und Enzymaktivität keineswegs vollkommen parallel laufen.

1) ZUR FRAGE DER ORGAN- UND ARTSPEZIFITÄT UND IHRER FUNKTIONELLEN BEDEUTUNG

B.C.R. STRÖMBLAD macht in seiner Arbeit "Beobachtungen über Aminoxydase in menschlichen Speicheldrüsen" (25) darauf aufmerksam, dass die Verteilung dieses Fermentes in den verschiedenen Organen bisher wenig beachtet wurde. Es wird besonders auf die hohe Aktivität der MO der Gl. submaxillaris und der Gl. parotis hingewiesen. Bei diesen Organen lag der Sauerstoff-Verbrauch pro Std., pro g Gewebe angeblich weit über den bisher gefundenen Werten für Lebergewebe.

Um diese Frage zu klären, wurden beim Hund und beim Schwein Gl. submaxillaris, Gl. parotis, Pankreas und Leber wie angegeben homogenisiert, und die Enzymaktivität wurde mit Hilfe der Warburg-Apparatur bestimmt.

Die nachstehend tabellarisch aufgeführten Werte und die Kurven der Abbildungen 3 und 4 veranschaulichen, dass bei den einzelnen Organen ein und derselben Tierart ein sichtbarer Unterschied vor allem in einer anderen "Niveau-Einstellung" des Fermentsystems besteht, d. h. dass innerhalb der Art das Aktivitätsverhältnis von Organ zu Organ das gleiche ist wie bei anderen Arten; aber die absolute Höhe ist bei den verschiedenen Arten unterschiedlich. Womöglich spielen dabei Ausscheidungsprodukte der drüsigen Organe oder der Mitochondrien selbst eine Rolle. So konnte R. DANNEEL bei seinen Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop kleine Sekretkugeln erkennen, die bei Pankreasschnitten den Mitochondrien anliegen (8). Auch p_H -Wertverschiebungen durch die Drüsensekrete können u. U. eine veränderte Reaktionslage der Enzyme bedingen.

Ob und in welcher Weise Speichel die MO-Aktivität beeinflusst, wurde an Leber-Mitochondrien untersucht.

ABBILDUNG 3

spezifische Aktivität:

O_2 -Verbrauch μ Mol/2

- 1) 0.155 — x — Homogenat von Leber Hund (1 : 2)
Protein 82.8 mg/ml (für die Zeichnung auf 41.4 reduziert)
- 2) 0.127 — x — Homogenat von Pankreas Hund (1 : 2)
Protein 55.6 mg/ml
- 3) 0.119 — ▲ — Homogenat Gl.submax. Hund (1 : 2)
Protein 28.9 mg/ml

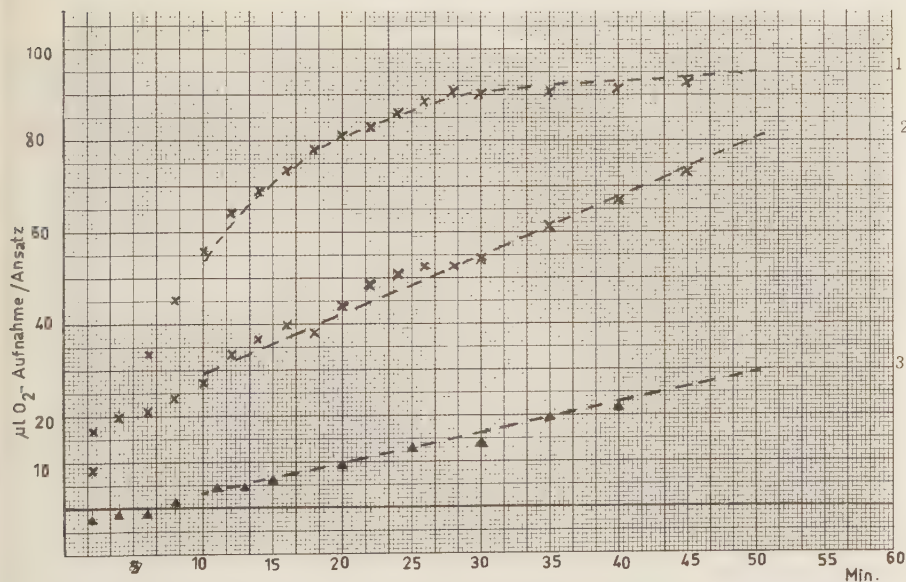


ABBILDUNG 4

spezifische Aktivität:

O_2 -Verbrauch $\mu\text{Mol}/2$

- 1) 0.220 — x — Homogenat von Leber Schwein
Protein 60 mg/ml
- 2) 0.133 — ▲ — Homogenat von Pankreas Schwein
Protein 45 mg/ml
- 3) 0.146 — x — Homogenat von Gl. Parotis Schwein
Protein 31.4 mg/ml
- 4) 0.127 — ▲ — Homogenat von Gl. submax. Schwein
Protein 30.3 mg/ml

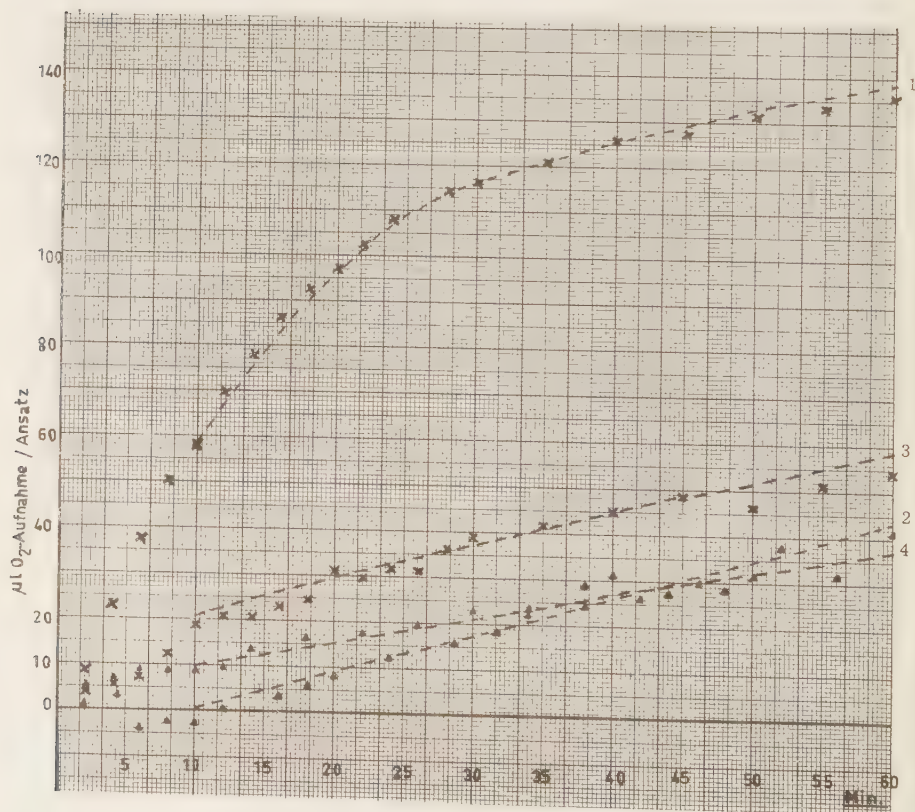


TABELLE 2: Gegenüberstellung der MO-Aktivität bei Präparaten von:
 Leber, Pankreas, Gl.parotis und Gl.submaxillaris beim Hund und
 beim Schwein.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	spezifische Aktivität: O ₂ -Verbrauch μ Mol/2
Homogenat von:		
Leber Hund	41.7	0.176
" Schwein	40.6	0.333
dto.	60.0	0.220
Pankreas Hund	55.6	0.127
" Schwein	45.0	0.133
Gl.parotis Hund	24.3	0.063
" Schwein	31.4	0.146
Gl.submax. Hund	28.9	0.119
" Schwein	30.3	0.127

TABELLE 3: Beeinflussung der MO-Aktivität durch Speichel:

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	Substrat:	spezifische Aktivität	
			O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol
Mitoch. Suspension				
Leber Schwein	45.5	Tryptamin	0.322	0.357
dto.	45.5	Speichel M.	xxx	0.154
dto. u. 0.5 ml				
Speichel M. je Ans.	51.3	Tryptamin	0.282	0.296

Das Präparat wurde mit der angegebenen Menge menschlichen Speichels 3 Stunden vorinkubiert.

2) ZUR FRAGE DER FERMENTAKTIVIERUNG DURCH EINE KÖRPEREIGENE SUBSTANZ, UND DIE WIRKUNG VON PYRIDOXALPHOSPHAT AUF DIE MONAMINOXYDASE-AKTIVITÄT VERSCHIEDENER ORGANE

Eine besonders hohe Aktivität und ein abweichendes Verhalten von den übrigen Enzym-Präparaten zeigen vor allem die Lebermitochondrien. Es erhebt sich die Frage, wodurch dieser Unterschied bedingt ist: ob in der Leber u.U. eine eigene Substanz bzw. ein eigenes Substrat vorhanden ist, das die hohe "Initial-Aktivität" und die relativ hohe "spezifische Aktivität" verursacht?

Zur Überprüfung wurde aus frisch bezogener Schweineleber auf folgende Weise ein Extrakt hergestellt:

79.0 g Schweineleber (Lb.S) wurde mit der doppelten Menge = 158.0 ml 96 % Alkohol homogenisiert und anschliessend in der Kühlzentrifuge 45 Minuten bei 18 000 x g zentrifugiert.

Das leicht gelblich gefärbte Überstehende wurde auf ca. 1/8 des Volumens eingengt. Dadurch entstand ein zähflüssiger, hellgelblicher Extrakt (Lb.Ex), von dem 0.5 ml den Versuchsansätzen in der üblichen Weise als Substrat zugefügt wurden. Ausserdem wurden Konkurrenz-Versuche durchgeführt, bei denen gleichzeitig Tyramin bzw. Tryptamin und Leberextrakt als Substrat den Mitochondrien-Aufschwemmungen beigegeben wurden.

Die Versuchsergebnisse sind den nachfolgenden Aufstellungen und Kurven zu entnehmen.

Die errechneten und aufgezeichneten Werte unserer Versuche zeigen sehr deutlich, dass sich tatsächlich in der Leber eine Substanz befindet, die als Eigen-substrat wirksam ist und eine merkliche Steigerung der Monaminoxidase-Aktivität hervorruft. Durch Zugabe des Leber-Extraktes zu Fermentpräparaten anderer Organe, z.B. Lunge und Niere kann im Konkurrenzversuch eine gesteigerte Anfangs-Aktivität und damit eine erhöhte "Niveau-Einstellung" dargestellt werden. Es lässt sich somit der eigenartige Kurvenverlauf bei "ungereinigten" Leberhomogenaten wie unter Abschnitt B 5 beschrieben erklären. Ausserdem ergibt die Gesamtaktivität bei gleichzeitiger Zugabe von Tyramin bzw. Tryptamin und Leber-Extrakt als Substrat eine erstaunlich genaue Summierung der Einzelwerte.

Damit erhebt sich die Frage, worauf die aktivitätssteigernde Wirkung dieses Extraktes beruht. Es ist denkbar, dass über den Weg einer Transaminase mehr Aminosäuren der oxydativen Desaminierung zugänglich gemacht werden, und dass bei diesem Vorgang Pyridoxalphosphat eine wirksame Rolle spielt. Dieses Derivat der Vitamin-B₆-Gruppe ist die aktive Co-Ferment-Form, die bei metabolischen Umwandlungen und besonders bei Wachstumsprozessen nachgewiesen werden konnte. Entsprechend den ständigen Umbau- und Umwandlungsprozessen in der Leber, sind die Leber-Mitochondrien besonders reich an Transaminase. So scheint es möglich, dass Pyridoxal-5-phosphat die Höhe der desaminierenden Prozesse mitbestimmt.

TABELLE 4: Aktivität der MO aus Lungen- und Nieren-Gewebe vom Schwein unter Zugabe von:
Tyramin bzw. Tryptamin, Leberextrakt (siehe Angaben im Text) und Tyramin bzw. Tryptamin + Leberextrakt als Substrat.

Ferment:	Protein: mg/ml	Substrat:	spezifische Aktivität		Versuchs- Zeit
			O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol	
Homog. <u>Lg. S.</u> (1 : 3)	35.6	Tyramin bzw. Tryptamin	0.185	0.235	40/60'
dto.	35.6	Leber-Ex.	0.126	0.320	40'
dto.	35.6	Tryptamin u. Leber-Ex.	0.308	0.520	40'
Homog. <u>Ni. S.</u> (1 : 4)	43.2	Tyramin	0.183	0.516	40'
dto.	43.2	Leber-Ex.	0.072	0.266	40'
dto.	44.5	Tyramin u. Leber-Ex.	0.257	0.742	40'
dto. u. 525 -A 10 ⁻³ m E.-Konz.	43.2	Tyramin	0.011	0.024	40'

525 - A = β -Diäthylaminoäthyl-Diphenylpropylacetat-HCl als Hemmkörper wirksam.

Lg. S. = Lunge Schwein,

Ni. S. = Niere Schwein.

ABBILDUNG 5: Beeinflussung der MO-Aktivität durch Leberextrakt:

Homogenat von Niere Schwein (1 : 4), Protein 43,2 mg/ml

Substrat: Tyramin — x — x —

Leberextrakt — o — o —

Tyramin und Leberextrakt — ▲ — ▲ —

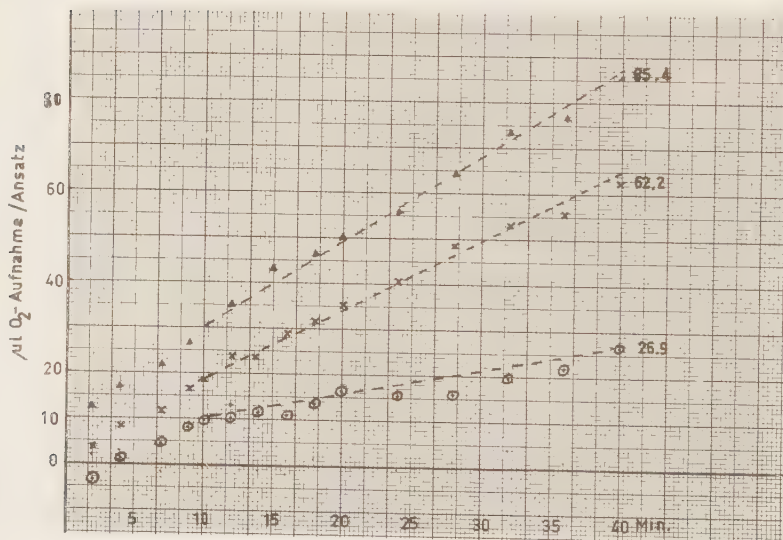


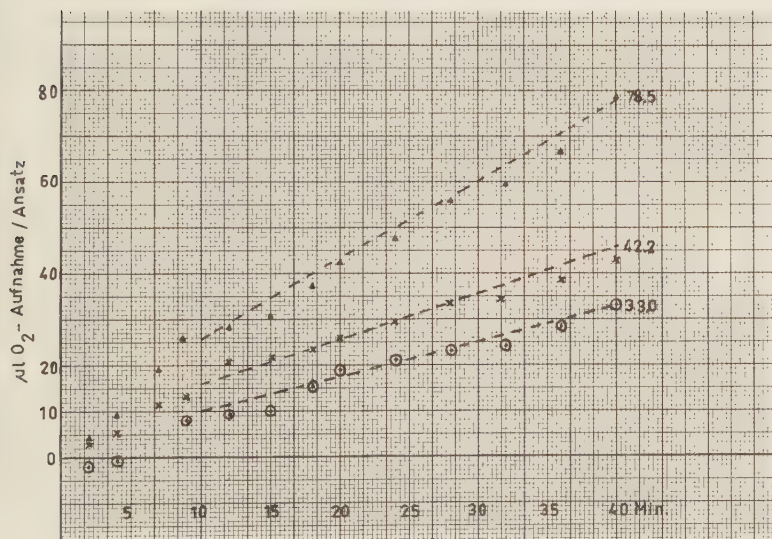
ABBILDUNG 6: Beeinflussung der MO-Aktivität durch Leberextrakt:

Homogenat von Lunge Schwein (1 : 3), Protein 35,6 mg/ml

Substrat: Tyramin/Tryptamin

Leberextrakt

Tryptamin und Leberextrakt



Zur Aufklärung des Mechanismus wurden folgende Versuche angeschlossen:

Ein Enzympräparat wurde aus frisch bezogener Schweineleber gemäss unseren Standardbedingungen hergestellt und mit und ohne Zusatz von Pyridoxalphosphat der Aktivitätsbestimmung unterworfen. Mit Rücksicht auf die unter Abschnitt C 3 erwähnten Beobachtungen wurden diese Untersuchungen auch auf Placenta- und Uterus-Gewebe ausgedehnt.

Die Ergebnisse sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen. Die Aufzeichnungen der Tabelle 5 lassen erkennen, dass Marsilid wie bekannt das Fermentssystem stark hemmt.

Pyridoxalphosphat zeigt bei Leber- und Placenta-Gewebe nicht den erwarteten aktivierenden sondern besonders bei längerer Vorinkubation einen hemmenden Effekt, der beim O_2 -Verbrauch stärker sichtbar wird als bei der NH_3 -Entwicklung.

Dagegen wird am Enzym-Präparat des Uterus eine Aktivierung durch Pyridoxalphosphat deutlich.

Wir erkennen, wie auch aus den Darstellungen im nachfolgenden Kapitel, die Sonderstellung des Uterus im fermentativen Geschehen.

Die negative Beeinflussung der oxydativen Desaminierungsvorgänge bei den Leber-Mitochondrien ist vermutlich auf die physiologische Wirkung des Pyridoxins als Antioxydans zurückzuführen. Nach HOVE und HARRIS verhindert Vitamin B_6 die Oxydation ungesättigter Fettsäuren. Es besteht also ein Regulationsmechanismus zwischen Protein- bzw. Aminosäurestoffwechsel, Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel durch das Einschalten einer Transaminase.

Obwohl zwischen dem Leber-Extrakt und dem Wirkungsmechanismus des Pyridoxalphosphates keine parallellaufende direkte Beziehung besteht, ist eine indirekte Beeinflussung denkbar. So kann u.U. durch ein erhöhtes Decarboxylierungsvermögen vermehrt Eigensubstrat gebildet werden, das im Endeffekt den nachweisbaren Aktivitätsanstieg hervorruft.

TABELLE 5: MO-Aktivitätsveränderung durch Zugabe von Pyridoxalphosphat bei Präparaten aus Schweine-Leber, menschlicher Placenta und Uterus-Gewebe vom Schwein.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	spezifische Aktivität		Aktivierung in % (+) Hemmung in % (-)	
		O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol	O ₂ -Verbr.	NH ₃ -Entw.
R.Std. v.U.Z.	29.0/	1.376	0.925		
<u>Lb.S.</u>	26.7				
dto. u. Marsilid 10 ⁻³ m	29.0	0.035	0.155	- 97.5	- 84.5
dto. u. Pyrid.- phosph. 10 ⁻⁴ m +	26.7	0.944	0.874	- 31.4	- 5.5
dto. u. Pyrid.- phosph. 10 ⁻³ m x	26.7	1.182	0.844	- 14.0	- 9.0
R.Std. v.U.Z.	16.2	1.160	1.075		
<u>Plac.M.</u>					
dto. u. Pyrid.- phosph. 10 ⁻³ m x	16.2	1.040	0.936	- 10.4	- 13.0
R.Std. v.U.Z.	22.5	0.090	0.107		
<u>Ut.S.</u>					
dto. u. Pyrid.- phosph. 5 x 10 ⁻³ m x	22.5	0.115	0.140	+ 28.0	+ 30.0
dto. u. Pyrid.- phosph. 2 x 10 ⁻³ m x	22.5	0.098	0.120	+ 9.0	+ 12.0

Erläuterungen:

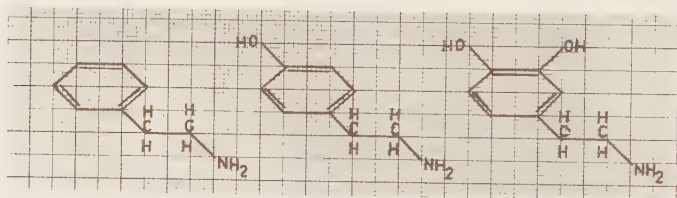
R.Std. v.U.Z. = Sediment vom Ultrazentrifugat
Lb.S. = Leber Schwein
Plac.M. = Placenta Mensch
Ut.S. = Uterus Schwein

+ das Enzympräparat wurde mit der angegebenen Menge Pyridoxal-5-Phosphat 3 Std. bei Zimmertemperatur vorinkubiert;
x Zugabe von Pyridoxal-5-Phosphat ohne Vorinkubation.
Die Versuchsdauer betrug 40 Minuten;
als Substrat wurde Tyramin (10⁻²m Endkonz.) zugegeben.

3) VERGLEICH DER MONAMINOXYDASE-AKTIVITÄT BEI AROMATISCHEN MONO-, DI-HYDROXYLIERTEN UND NICHT HYDROXYLIERTEN SUBSTRATEN

In den bisher vorliegenden Arbeiten wurde das Verhalten der hydroxylierten Substrat-Derivate aromatischer Amine gegenüber MO verschiedener Organe wenig beachtet. Wir haben deswegen zunächst Abkömmlinge von Tyramin und Tryptamin wie Dopamin, β -Phenyläthylamin; Serotonin und 6-Hydroxy-Serotonin, Leber- und Nieren-Mitochondrien als Substrat zugesetzt.

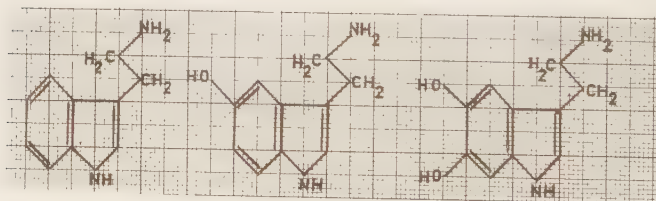
Die Prüfungen wurden später auf die MO des Uterus, Gehirns und der menschlichen Placenta ausgedehnt.



β -Phenyl-Äthylamin

Tyramin

Dopamin



Tryptamin

Serotonin

6-Hydroxy-Serotonin

Eine Gegenüberstellung der gefundenen Werte zeigen die nachstehenden Aufstellungen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass nicht alle vorerwähnten Substrate in genügender Menge zur Verfügung standen, um systematisch bei den einzelnen Homogenaten erprobt zu werden.

TABELLE 6: Gegenüberstellung der MO-Aktivität bei Präparaten aus Schweine-Leber unter Zugabe von: Tyramin, Dopamin, β -Phenyläthylamin als Substrat.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	Substrat:	spezifische Aktivität	
			O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol
Homog. <u>Lb.S.</u>	46.0	Tyramin	0.655	mehr als 0.600 +
dto.	46.0	Dopamin	0.620	mehr als 0.600 +
<u>Lb.S.</u> u. <u>Kin.</u> <u>R.Std. v.U.Z.</u>	54.4	Tyramin	0.695	0.706
dto.	54.4	β -Phen. - Äth. -amin	0.081	0.174
dto. (verdünnt)	24.4	Tyramin	0.975	0.895
dto. (verdünnt)	24.4	β -Phen. - Äth. -amin	0.056	0.295
dto. (verdünnt)	18.5	Tyramin	1.558	1.275
dto. (verdünnt)	18.5	β -Phen. - Äth. -amin	0.156	0.276

Erläuterungen:

- Lb.S. = Leber Schwein;
 Kin. = "Kinetin" = Hyaluronidase der Firma Schering A.G.,
 Berlin,
 hierzu siehe Bemerkungen unter C 6;
 R.Std. v.U.Z. = Sediment vom Ultrazentrifugat (das Homogenat wurde in
 der SPINCO-Kühlzentrifuge 60 Min. bei 78 400 x g zen-
 trifugiert);

Die Versuchsdauer betrug einheitlich bei allen Versuchen 40 Minuten.

+ Es wurde zu wenig H₂SO₄ vorgegeben.

TABELLE 7: Gegenüberstellung der MO-Aktivität bei Präparaten aus Schweine-Leber
unter Zugabe von: Tryptamin, Serotonin, 6-Hydroxyserotonin als Substrat.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	Substrat:	spez. Aktivität	
			O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol
Homog. <u>Lb.S.</u> u. Ascorb.-Säure $5 \times 10^{-3}m$	33.0	Tryptamin	0.685	0.364
dto.	33.0	Serotonin	0.270	0.127
dto.	33.0	Serot. ['] +	0.174	0.046

Erläuterungen:

Lb.S. = Leber Schwein. Versuchsdauer = 60 Minuten.

+ Serot.['] = 6-Hydroxyserotonin (Herrn Dr. Schlossberger vom Max-Planck-Institut München für die freundliche Überlassung des Substrates unseren verbindlichsten Dank.)

TABELLE 8: Gegenüberstellung der MO-Aktivität bei Präparaten aus Schweine-Nieren

unter Zugabe von: Tyramin, Dopamin, β -Phenyläthylamin, Tryptamin und Serotonin als Substrat.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	Substrat:	spezifische Aktivität		Versuchs- Zeit
			O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol	
Homog. <u>Ni. S.</u>	42.6	Tyramin	0.356	0.370	40'
dto.	42.6	Dopamin	0.306	0.243	40'
dto.	34.6	Tyramin	0.446	0.304	40'
dto.	34.6	β -Phen. - Äth. -amin	0.048	0.138	40'
dto.	34.6	Tyramin u. β . -Ph. -Äth. je 0.5 ml	0.042	0.169	40'
dto.	22.3	Tyramin	0.575	0.590	40'
dto.	22.3	β -Phen. - Äth. -amin	0.055	0.107	40'
dto.	22.3	Tryptamin	0.680	0.640	60'
dto.	22.3	Serotonin	0.170	0.255	60'

Diese Werte zeigen in Übereinstimmung mit den Vorversuchen, dass die relativ höchste Aktivität bei verhältnismässig starken Verdünnungen liegt. Zugabe von Kreatinin-Sulfat zu Tryptamin, das bei Serotonin stets beigegeben ist, verursacht keine Aktivitätsänderung, auch das Hinzufügen von Ascorbin-Säure zum Ferment beeinflusst die MO nicht.

Bei Ausdehnung der Versuchsdauer über 40 Minuten verschieben sich die Resultate besonders bei der Leber zu Gunsten des Sauerstoffverbrauchs, wie unter Abschnitt B 3 bereits ausgeführt.

Die Aktivitätswerte bei Tyramin als Substrat liegen vor allem bei den Nieren-Präparaten etwas unter denen von Tryptamin; E. HENNIG konnte die gleiche Beobachtung bei MO-Bestimmungen von foetalen Geweben machen (11). Dieser Unterschied ist aber nur gering und bei Lebermitochondrien kaum feststellbar.

Auch die Zugabe von Dopamin als Substrat zeigt gegenüber Tyramin nur eine mässige Aktivitätsminderung, in den vorliegenden Fällen ist die Ausbeute 5 % bzw. 14 % geringer.

Einschneidende Wertänderungen zeigen sich dagegen bei Verwendung von β -Phenyl-Äthylamin, 6-Hydroxy-Serotonin und Serotonin als Substrat.

Betrachten wir neben den tabellarischen Ergebnissen den kurvenmässigen Verlauf des Substratabbaues, so fällt bei Nieren- und Leber-Präparaten besonders bei Zugabe von β -Phenyl-Äthylamin das spontane Nachlassen der Aktivität nach einem normalen Anstieg in den ersten 5 bis 10 Minuten auf. Nach diesem Verhalten der Fermentaktivität in den ersten Minuten zeigt sich anschliessend beim Substratabbau ein wellenförmiger Verlauf wie beim Einsatz sehr geringer Fermentkonzentrationen (siehe Abb. 1/2). Beim Serotonin ist diese Änderung nicht so ausgeprägt, es lässt sich vielmehr von Anfang an eine geringere Aktivität beobachten. Bei gleichzeitiger Zugabe von β -Phenyl-Äthylamin und Tyramin überwiegt der Einfluss des ersten, des nicht hydroxylierten Amins.

ABBILDUNG 7: Gegenüberstellung der MO-Aktivität unter Zugabe von:

Homogenat von Leber Schwein, Protein 33.0 mg/ml

Substrat: Tryptamin — x — x —

Serotonin — ▲ — ▲ —

6-Hydroxyserotonin — ○ — ○ —

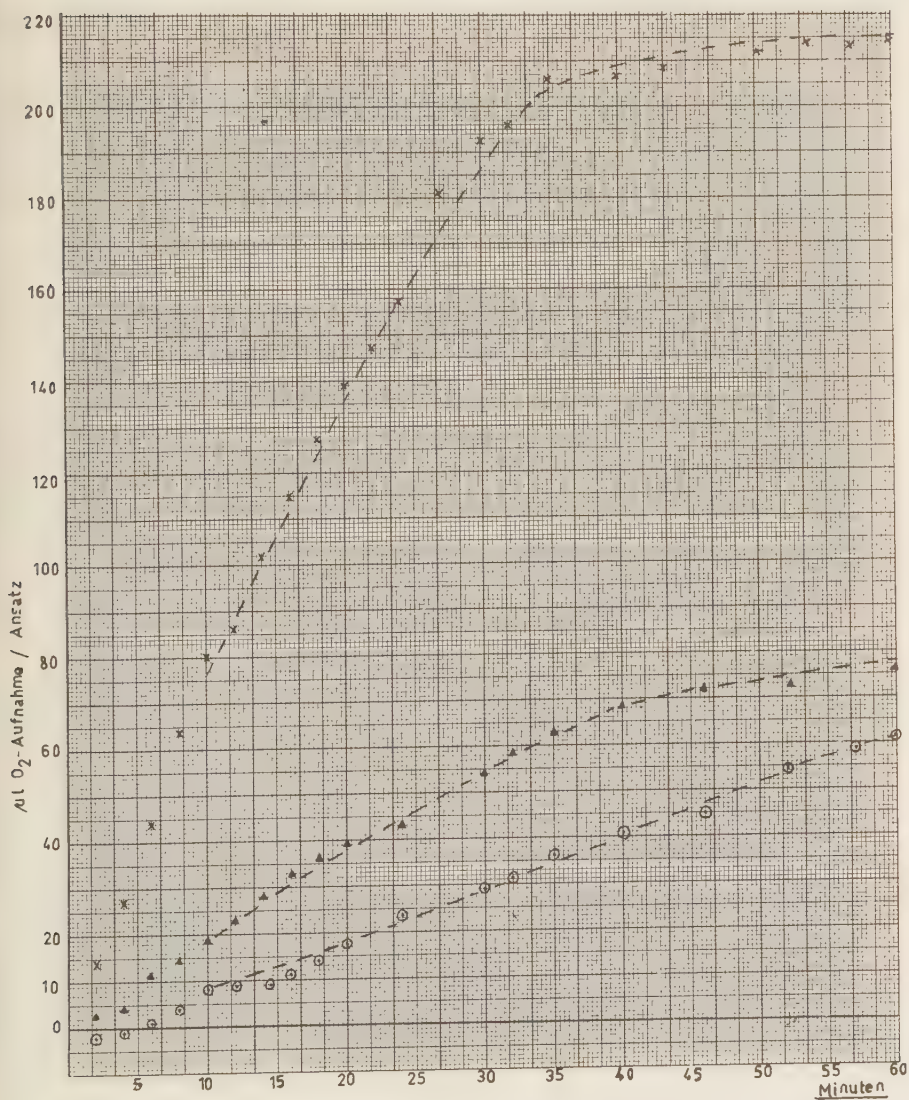


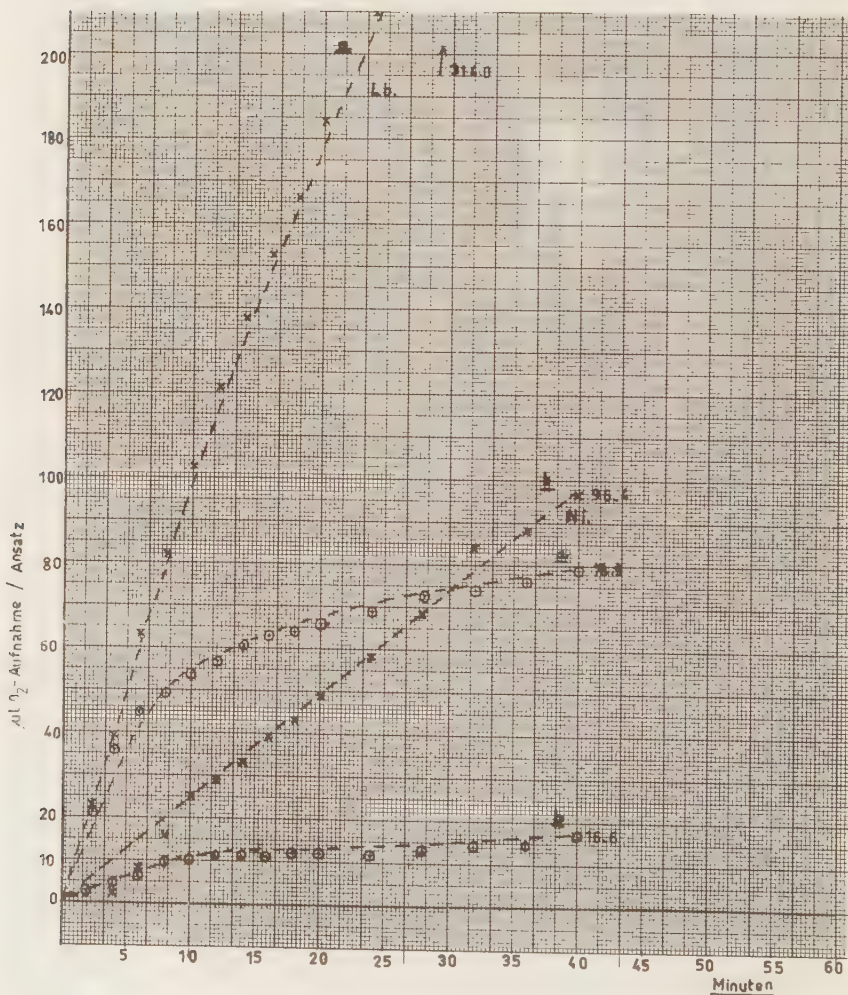
ABBILDUNG 3: Gegenüberstellung der MO-Aktivität unter Zugabe von:

Tryptamin $\equiv \times \equiv \times$ bzw.

β -Phenyl-Äthylamin $\equiv \odot \equiv \odot$ als Substrat.

a) Rückstand vom Ultrazentrifugat: Leber Schwein und "Kinetin"
(siehe S. 71) Protein 54.4 mg/ml

Rückstand vom Zentrifugat: Niere Schwein, Protein 44.6 mg/ml



In grundlegend anderes Verhalten gegenüber den bisher untersuchten Organpräparaten zeigen die Fermentpräparate von Uterus, Hirnstamm und Rückenmark, wie aus den anschliessend aufgeführten Versuchsergebnissen zu entnehmen ist.

TABELLE 9:

Ferment:	Protein: mg/ml	Substrat:	spezifische Aktivität		Versuchs- Zeit
			O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol	
Homog. <u>Ut. S.</u> R. Std. v. Z.	34.6	Tryptamin	0.054	0.081	60'
dto.	34.6	Serotonin	0.082	0.029	60'
dto.	34.6	Tyramin	0.190	0.295	60'
dto.	34.6	Dopamin	0.185	0.208	60'
dto.	34.6	β-Phen. - Äth. -amin	0.062	0.020	60'
Homog. <u>Br. St. S.</u> R. Std. v. U. Z.	34.0	Tryptamin	0.047	0.088	50'
dto.	34.0	Serotonin	0.073	0.067	50'
dto.	34.0	Tyramin	0.154	0.243	50'
dto.	34.0	β-Phen. - Äth. -amin	0.076	0.007	50'
Homog. <u>RM. S.</u> R. Std. v. U. Z.	47.0	Tryptamin	0.009	0.028	50'
dto.	47.0	Serotonin	0.024	0.008	50'
dto.	47.0	Tyramin	0.043	0.054	50'
dto.	47.0	β-Phen. - Äth. -amin	0.028	0.005	50'

Erläuterungen:

Ut. S. = Uterus Schwein;

Br. St. S. = Hirn-Stamm Schwein;

RM. S. = Rückenmark Schwein.

Auffallender Weise liegt die Sauerstoffaufnahme bei Serotonin wesentlich höher als bei Tryptamin, die NH_3 -Werte verhalten sich dagegen umgekehrt. Diese beiden Substrate scheinen für Uterus, Gehirn und Rückenmark überhaupt ungünstig zu sein, durch Zugabe von Tyramin und Dopamin wird eine wesentlich höhere Aktivität erreicht, auch stimmen bei den letztgenannten Substraten NH_3 -Entwicklung und O_2 -Verbrauch besser überein. So scheint die MO der zuvor aufgeführten Organe aromatische Amine mit dem Benzolring als Substrat zu bevorzugen. Hiermit lassen sich die Beobachtungen von A. HORITA und W. R. McGRATH über spezifische Leber- und Hirn-Monaminoxidase Hemmung (13) in Beziehung setzen. Auch die Mitteilungen von P. HOLTZ u. Mitarb. (12) über die mögliche Verlängerung der Evipan-Narkose durch Serotonin, Tryptamin und die entsprechenden Aminosäuren, nicht aber durch Hydroxytyramin und Dioxyphenylalanin, lassen sich mit dem von uns festgestellten unterschiedlichen Substratabbau in Einklang bringen. Über die Sonderstellung der Uterus-MO wurden uns keine Mitteilungen bekannt.

Die MO-Aktivität des Kleinhirns dagegen ist relativ hoch und zeigt im Verhalten Ähnlichkeit mit den Fermentpräparaten der drüsigen Organe. Eine gewisse Übereinstimmung lässt sich vor allem mit der MO der Niere feststellen. Beiden Organen ist eine verhältnismässig hohe NH_3 -Entwicklung gemeinsam.

Wird das Ferment aus der gesamten Hirnmasse gewonnen, so lässt sich mit Tyramin als Substrat wiederum das weitaus beste Resultat erzielen. Die NH_3 -Werte liegen auch hier relativ hoch.

TABELLE 10: Gegenüberstellung der MO-Aktivität bei Präparaten aus
Kleinhirn Schwein und
Gesamthirn Schwein
unter Zugabe von: Tyramin, β -Phenyläthylamin, Tryptamin und
Serotonin als Substrat.

Fermentpräparat:	Protein mg/ml	Substrat:	spezifische Aktivität	
			O_2 -Verbr. μ Mol/2	NH_3 -Entw. μ Mol
Homog. <u>Br.kl.S.</u>				
R.Std. v.U.Z.	24.7	Tyramin	0.200	0.494
dto.	24.7	β -Phen.- Äth.-amin	0.033	0.117
dto.	24.7	Tryptamin	0.235	0.532
dto.	24.7	Serotonin	0.081	0.323
Homog. <u>Br.S.</u>				
R.Std. v.U.Z.	33.3	Tyramin	0.155	0.162
dto.	33.3	β -Phen.- Äth.-amin	0.017	0.079
dto.	33.3	Tryptamin	0.056	0.151
dto.	33.3	Serotonin	0.053	0.198

Erläuterungen:

Br.kl.S. = Kleinhirn Schwein;

Br.S. = Gesamthirn Schwein;

R.Std. v.U.Z. = Sediment vom Ultrazentrifugat;

Die Versuchsdauer betrug bei allen Versuchen 50 Minuten.

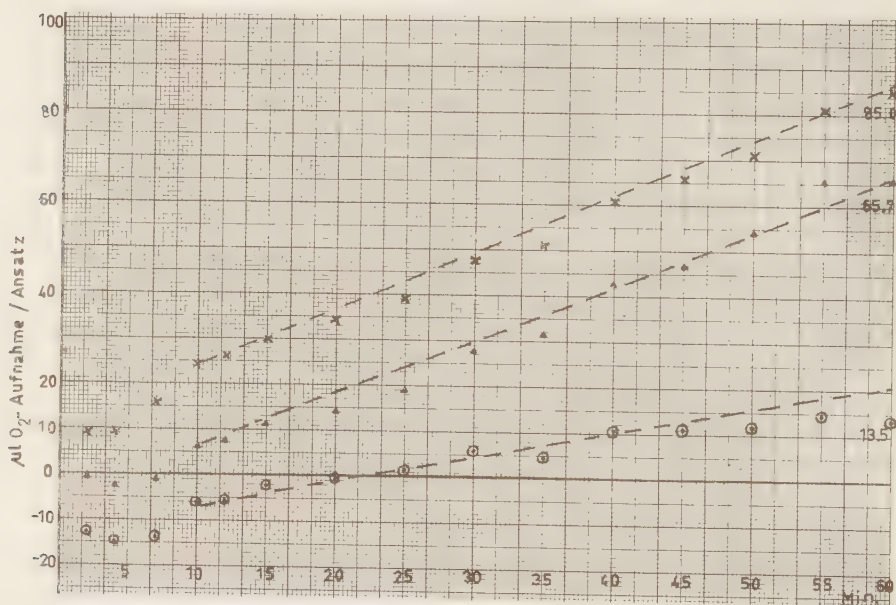
ABBILDUNG 9: Gegenüberstellung der MO-Aktivität unter Zugabe von:

Tyramin —x—x—

Dopamin —▲—▲—

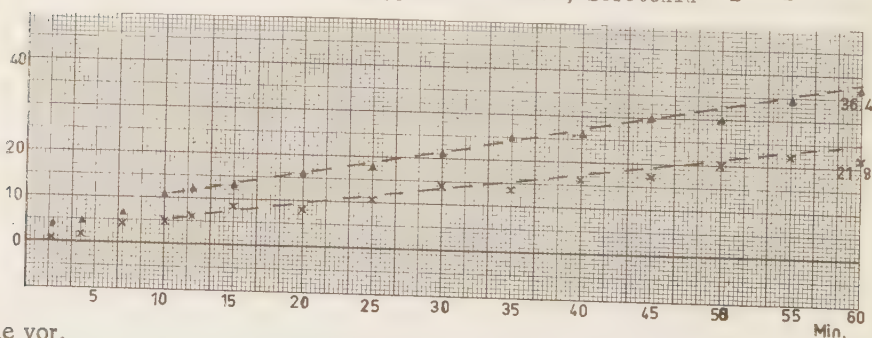
β-Phenyl-Äthylamin —○—○— als Substrat.

Rückstand vom Zentrifugat: Uterus Schwein.



wie vor,

als Substrat: Tryptamin —x—x—, Serotonin —▲—▲—



wie vor,

als Substrat: Tryptamin

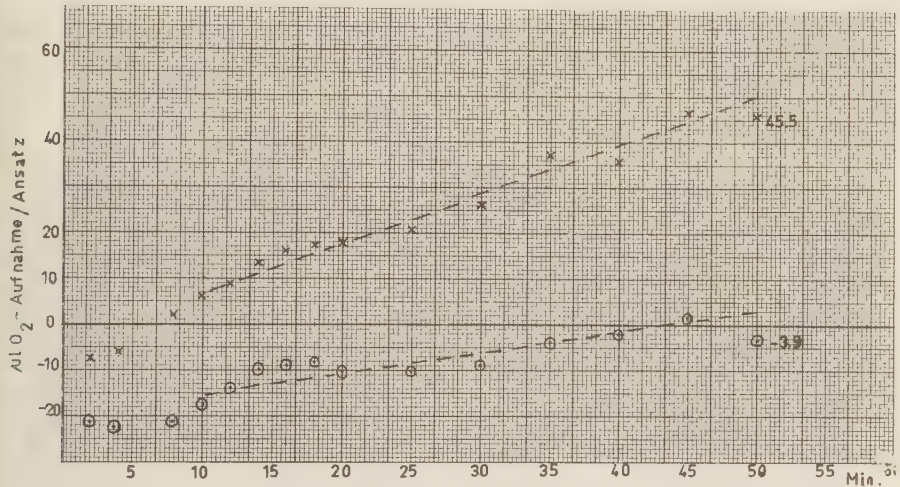
Serotonin

ABBILDUNG 10: Gegenüberstellung der MO-Aktivität unter Zugabe von:

Tyramin — x — x —

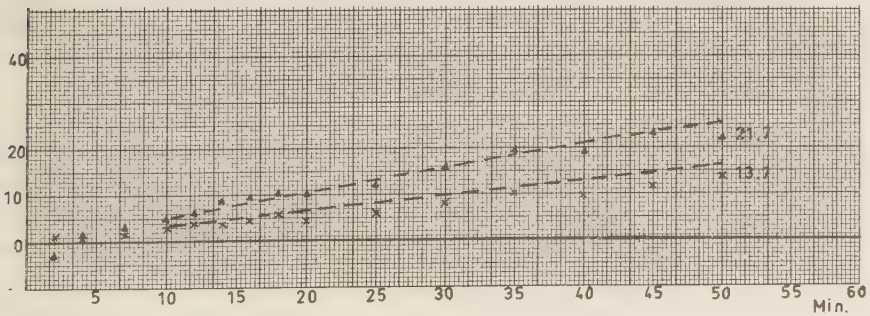
β -Phenyl-Äthylamin — o — o — als Substrat.

Rückstand vom Ultrazentrifugat: Hirn-Stamm Schwein.



wie vor,

als Substrat: Tryptamin — x — x —, Serotonin — Δ — Δ —



wie vor,

als Substrat:

Serotonin

ABBILDUNG 11: Gegenüberstellung der MO-Aktivität unter Zugabe von:

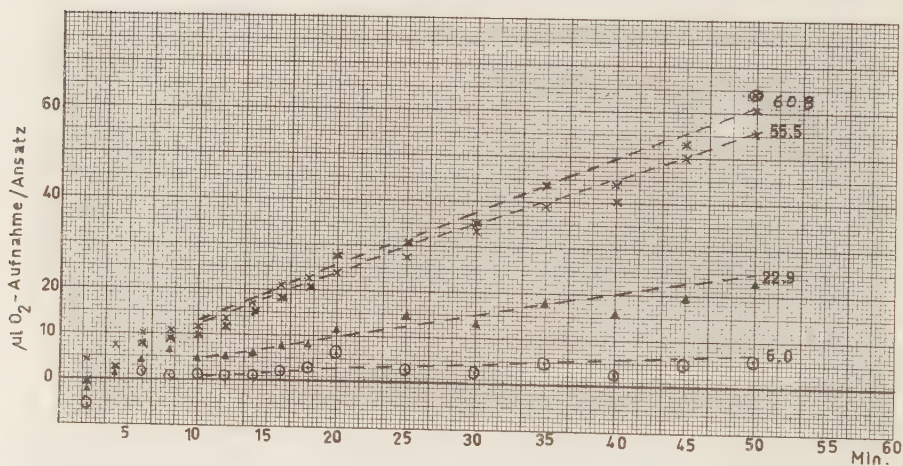
Tyramin —x—x—

β -Phenyl-Äthylamin —o—o—

Tryptamin —x—x—

Serotonin —▲—▲— als Substrat.

Rückstand vom Ultrazentrifugat; Kleinhirn Schwein.



Es wurde noch die Prüfung von zwei menschlichen Placenten angeschlossen, da über Vorkommen und Verhalten der Aminoxydasen in Placenta-Gewebe bisher wenig bekannt ist.

Ein Homogenat aus Placenta-Gewebe wurde nach den Standardbedingungen hergestellt und anschliessend scharf zentrifugiert. Sowohl der intensiv rote, fast klare Überstand und der mit Phosphatpuffer aufgerührte Niederschlag wurden der Aktivitäts-Bestimmung unterworfen.

Wie die nachstehenden Resultate zeigen, verhält sich das Ferment der ungetöten Zellbestandteile ähnlich wie bei entsprechenden Leber- und Nieren-Präparaten. Marsilid (Isopropyl-Isonicotinsäure-Hydrazid) übt die bekannte starke Enzymhemmung auch hier aus.

Der intensiv rot gefärbte Überstand war eiweissreich (66 bzw. 74 mg/ml), eine MO-Aktivität konnte aber nicht registriert werden.

Die Substratspezifität der MO lässt sich somit weiter unterteilen:

Bei Leber-, Nieren-, Kleinhirn- und Placenta-Präparaten lassen sich durch Zugabe von Tryptamin und Tyramin die besten Ergebnisse erzielen; dabei liegen die Werte für Tryptamin besonders bei Nieren-, Kleinhirn- und Placenta-Mitochondrien etwas über denen von Tyramin. Gleiche Berichte liegen über das Verhalten von foetalem Gewebe vor (27). Die Einführung von Hydroxyl-Gruppen in 5- und 6-Stellung bei den Indolderivaten verursacht eine deutliche Aktivitätsminderung. Dagegen zeigt Dopamin gegenüber Tyramin nur eine geringe negative Wertverschiebung. Besonders stark wird der Einwirkungsbereich des Fermentsystems durch β -Phenyl-Äthylamin verändert.

Bei Uterus, Hirnstamm und Rückenmark sind die Indol-Abkömmlinge als Substrate ungeeignet. Der beste Substratumsatz wird durch Zugabe von Tyramin und Dopamin erreicht. Da der O_2 -Verbrauch bei Serotonin im Vergleich zu Tryptamin deutlich erhöht ist, müssen wir auf eine Mitbeteiligung der aromatischen Hydroxyl-Gruppe in 5-Stellung bei den oxydativen Prozessen schliessen. β -Phenyl-Äthylamin verursacht auch bei diesen Organ-Präparaten die grössten Wertverschiebungen.

Aus den Kurvenaufzeichnungen ist vor allem die Einstellung des Fermentsystems auf eine unterschiedliche "Niveauhöhe" je nach Substratcharakter zu erkennen. Wir können somit folgern, dass die Eigenart des Substrates für den Wirkungsbereich der fermentativen Tätigkeit mit verantwortlich ist.

TABELLE 11: Gegenüberstellung der MO-Aktivität bei Präparaten aus menschlichem Placenta-Gewebe
unter Zugabe von: Tyramin, β -Phenyläthylamin, Tryptamin und Serotonin als Substrat.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	Substrat:	spezifische Aktivität	
			O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol
Homog. Pl. M.				
R. Std. v. U. Z.	25.0	Tyramin	1.110	1.140
dto.	19.8	β -Phen. - Äth. -amin	0.430	0.343
dto.	19.8	Tryptamin	1.230	1.230
dto.	19.8	Serotonin	0.465	0.675
dto. u. Marsilid 10 ⁻³ m Endkonz.	25.0	Tryptamin	0.386	0.294

Erläuterungen:

- Pl. M. = menschliche Placenta (eines neugeborenen Knaben, 47 cm lg., 2100 g Gew.; Partus am 12.9.60, 7 Wo. vor Geburtstermin bzw. eines neugeborenen Mädchen, 47 cm lg., 3100 g Gew.; Partus am 26.9.60, termingerecht);
- R. Std. v. U. Z. = Sediment vom Ultrazentrifugat (das Homogenat der frisch bezogenen Placenta wurde in der SPINCO-Kühlzentrifuge 60 Min. bei 78 400 x g zentrifugiert).

Die Versuchsdauer betrug bei allen Versuchen 40 Minuten.

4) DIE GEGENSEITIGE BEEINFLUSSUNG VON DIAMINO- UND MONAMINO-OXYDASE

Bei allen untersuchten Organen konnte neben der MO auch in geringem Masse eine lösliche DO festgestellt werden. Die eigenen Messergebnisse stimmten mit den Angaben von E. A. ZELLER (29) und W. P. BURKHARD (6) gut überein.

Die Frage, ob und in welcher Weise sich DO und MO gegenseitig beeinflussen, wurde bisher nicht einwandfrei geklärt.

Deshalb wurden von uns die Placenta-Präparate auch auf ihr Verhalten gegenüber verschiedenen Diaminen geprüft. Ausserdem wurden Konkurrenzversuche unter gleichzeitiger Zugabe von Tryptamin und Histamin sowie Tryptamin und Spermidin durchgeführt. Die Versuchsansätze wurden nach den allgemein gültigen Vorschriften, wie bei E. HENNIG (11) ausführlich angegeben, hergestellt. Semicarbazid und KCN wurden bei den erwähnten Konkurrenzversuchen den Ansätzen nicht zugefügt.

Eine geringe DO-Aktivität war im eiweissreichen Überstehenden feststellbar, die bei Zugabe verschiedener Substrate - Cadaverin, Histamin und Spermidin - sich zu erkennen gab, wobei der bekannte Unterschied in der Umsatzgeschwindigkeit zutage trat. Es zeigte sich vor allem ein unterschiedliches Verhalten in der "Niveau-Einstellung". Ähnlich wie bei den Vergleichswerten: Mo-Tyramin, - β -Phenyl-Äthylamin, lag diese Anfangs-Einstellung des Fermentes bei Histamin als Substrat besonders niedrig.

Setzen wir die Abbaugeschwindigkeit von Cadaverin = 100, so ergeben sich aus den angestellten Messungen folgende Verhältniszahlen:

Cadaverin:		Histamin:		Spermidin:	
NH ₃ -Entw.	O ₂ -Verbr.	NH ₃ -Entw.	O ₂ -Verbr.	NH ₃ -Entw.	O ₂ -Verbr.
100	100	18.0	28.6	29.4	39.3

In der Arbeit von D. AURES (31) werden für das Aktivitätsverhältnis von Cadaverin und Histamin ähnliche Vergleichszahlen angegeben.

Das Zusammenwirken der beiden Aminoxydasen brachte in den Konkurrenzversuchen die nebenstehend aufgeführten Ergebnisse. Dabei wurden jeweils 0.5 ml Substrat einer 10⁻²m Lösung zugegeben. Die im allgemeinen höher liegenden O₂-Werte sind zum Teil wahrscheinlich durch das Fehlen von Semicarbazid und KCN bei den Versuchsansätzen bedingt; da die enzymatische Weiteroxydation der in der Fermentreaktion entstehenden Aldehyde durch Aldehyd-Dehydrogenasen ohne diese Substanzen nicht verhindert wird (11).

Histamin scheint im Gegensatz zu Cadaverin und Spermidin die oxydative Desaminierung beim vorliegenden Präparat - Mitochondrien-Aufschwemmung einer menschlichen Placenta - eher zu hemmen als zu begünstigen. Die Beobachtungen, dass Histamin von der DO wesentlich langsamer abgebaut wird als Cadaverin und die zuvor erwähnte niedrige "Niveau-Einstellung" des Fermentesystems durch Zugabe von Histamin, lassen sich hiermit in Einklang bringen.

TABELLE 12: Konkurrenzversuche mit Tryptamin und Cadaverin,
Tryptamin und Histamin,
Tryptamin und Spermidin als Substrat.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	Substrat:	spezifische Aktivität	
			O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol
Homog. Pl. M. R. Std. v. U. Z.	25.0	Tryptamin u. Cadaverin	1.510	0.824
dto.	25.0	Tryptamin u. Histamin	1.275	0.672
dto.	25.0	Tryptamin u. Spermidin	1.510	0.756

Erläuterungen:

- Pl. M. = Menschliche Placenta (eines neugeborenen Knaben, 47 cm lg., 2100 g Gew.; Partus am 12.9.60, 7 Wo. vor Geburts-termin);
- R. Std. v. U. Z. = Sediment vom Ultrazentrifugat (das Homogenat der frisch bezogenen Placenta wurde in der SPINCO-Kühlzentrifuge 60 Min. bei 78 400 x g zentrifugiert).

Die Versuchsdauer betrug bei allen Versuchen 40 Minuten.

Auch M. MEDAKOVIC stellte eine entsprechende gegenseitige Beeinflussung der Histamin- und Serotonin-Werte bei seinen Tierexperimenten fest. Der Serotonin-Gehalt wurde im Rattenblut während eines experimentellen traumatischen Schocks kontrolliert. Während des Schocks lagen die 5-HT-Werte etwa 4 mal so hoch wie bei den Kontrolltieren. Die Serotonin-Werte im Blut adrenalectomierter Tiere lagen niedriger als bei normalen Tieren (32). Somit ist anzunehmen, dass während der Schock-Situation Serotonin nicht genügend abgebaut werden kann, da die MO durch eine übermässige Histamin-Ausschüttung gehemmt wird, bzw. nur verzögert wirksam werden kann. Bei den adrenalectomierten Tieren fällt dieser Steuerungsmechanismus fort, der Substratabbau durch MO-Aktivität in den Geweben verläuft ungestört, so dass niedrigere Blut-Serotonin-Werte resultieren.

Zugleich muss berücksichtigt werden, dass die Serotonin-Speicher bei den adrenalectomierten Tieren nicht mobilisiert werden. Es kommt also zu einem Summierungseffekt, der uns die grossen Wertverschiebungen des Serotoningehaltes verständlich macht.

Schon aus diesen wenigen Beispielen geht hervor, wie ausserordentlich wichtig für die normalen Körperfunktionen das harmonische Zusammenspiel der DO, MO mit den neuro-vegetativen Steuerungsmechanismen ist.

5) DIE AUSWIRKUNG PSYCHISCH WIRKSAMER SUBSTANZEN AUF DIE MON-AMINOXYDASE-AKTIVITÄT IN VITRO UND IN VIVO UNTER BEACHTUNG DER ORGANSPEZIFITÄT

Wenn wir bedenken, dass beim Menschen der Sauerstoff-Verbrauch des Gehirns $1/5$ des O_2 -Verbrauches des gesamten Körpers ausmacht, wird uns sofort die Wichtigkeit der mitochondrialen Funktionen für die Neurophysiologie klar.

Viele Forscher haben sich besonders in den letzten Jahren mit dem Stoffwechselproblem in verschiedenen Hirnzentren befasst. So wurde durch GADDUM u. Mitarb. bekannt, dass sich Serotonin vorwiegend im Hirnstamm und nicht in der Hirnrinde befindet. Untersuchungen von PAASONEN und McLEAN zeigten, dass eine besondere Affinität dieses biogenen Amins zum +) limbischen System besteht. Auch Noradrenalin und geringe Mengen von Adrenalin sind vor allem im Hypothalamus und im medialen Hirnstamm zu finden (14). Diese Stoffe, die zwar zuerst aus Körperorganen und Nerven ausserhalb des Gehirns gewonnen wurden, sind somit besonders reichlich in jenen Hirnteilen anzutreffen, die in enger Beziehung zum vegetativen Nervensystem stehen. Wie wir wissen, geht auch von diesen Zentren die Regulation des Trieb- und Affektverhaltens aus.

Schon 1953 konnten GADDUM, WOOLLEY und SHAW eine deutliche antagonistische Wirkung des 5-Hydroxytryptamins (5-HT) gegenüber dem aus dem Mutterkorn gewonnenen Lysergsäurediäthylamid (LSD) feststellen. Wiederum zunächst in der Peripherie, am Uterus, an dem bekanntlich durch LSD starke Kontraktionen ausgelöst werden. Daneben sind aber auch sehr starke zentrale, psychogene Wirkungen des LSD bekannt. Seit den Beobachtungen von HOFMANN und STOLL wissen wir, dass bereits durch sehr kleine Dosen dieser Substanz beim Menschen halluzinatorische Psychosen erzeugt werden. Körpergefühl-Sphäre und Raum-Zeit-Erleben ändern sich. Es tritt das Phänomen der "toxischen Introversion" auf, das auch vom Meskalinrausch bekannt ist. Die Kontaktaufnahme mit der Umwelt bleibt bei entsprechenden Willensanstrengungen möglich (14).

Ähnliche Indolabkömmlinge, die sich z.B. aus Pilzen gewinnen lassen, wie Psilocybin, wurden bereits in präkolumbischer Zeit von den Indianern bei religiösen Zeremonien genossen. Die Wirkung dieser "heiligen" Pilz-Substanzen ist eine psychische Veränderung, die in mancher Hinsicht in Parallele mit den echten, endogenen Psychosen gesetzt werden kann.

Es scheint uns wichtig, zur Klärung der Frage beizutragen, ob und in welcher Weise diese psychotoxischen Substanzen eine Änderung der MO-Aktivität verursachen.

+) Septum pellucidum, Nucleus amygdalae, Gyrus hippocampi

Bei einer 230 g schweren Albino-Ratte wurde 0.1 γ /g Körpergewicht in physiologischer Kochsalz-Lösung gelöstes LSD in die Schwanz-Vene injiziert (leichte Äther-Narkose).

Das Tier reagierte sofort mit einer verstärkten Pulsation, sowie Atmung und wirkte benommen. In den ersten 15 Minuten waren die Reflexe ausser dem Corneal-Reflex aufgehoben, anschliessend wurde von dem Tier eine normale Schlafstellung eingenommen. Auf verschiedene Reize liess sich nur eine sehr träge Reaktion beobachten, die Ratte zeigte immer wieder das Bedürfnis, in einen Schlaf- bzw. Dämmerzustand zu verfallen. Auch nach 1 Std. war dieses Verhalten noch unverändert. Jetzt erwachte zwar das Tier sofort bei kleinen körperlichen Berührungen und Lageveränderungen durch Verstellen des Käfigs, verfiel aber sehr schnell wieder in seinen "Halbschlaf"; auch auf akustische Reize (Pfeifen und Klopfen) wurde in ähnlicher Weise reagiert.

Sonst liessen sich keine pathologischen Veränderungen feststellen, die Atmung war normal, die Durchblutung der Extremitäten und Ohren ausgesprochen gut.

Nach 2 Std. war das Tier wieder etwas munterer, das geschilderte Verhalten war aber nicht wesentlich verändert. Die Hautsensibilität erschien gesteigert (auf leichte Berührung sofortige, kurzfristige Reaktion).

Jetzt, 2 Std. nach der Injektion, erfolgte Decapitation in leichtem Ätherrausch.

Leber, Nieren, Lungen und Gehirn wurden sofort sauber heraus präpariert, weitgehend von Bindegewebe befreit und nach kurzem Verweilen in der Kühltruhe in der angegebenen Weise mit m/15 Phosphat-Puffer, p_H 7.4, im Verhältnis 1 : 5 homogenisiert. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten nach den Standardbedingungen.

Zum Vergleich wurde eine unbehandelte Ratte derselben Rasse, 210 g schwer, in der vorbeschriebenen Weise getötet, die entsprechenden Organe wurden in genau derselben Weise präpariert und der Aktivitätsbestimmung unterworfen.

Das Vergleichstier zeigte gesundes, munteres Verhalten, reagierte weniger spontan auf Äther. Die Hautsensibilität (Schmerzempfinden) war scheinbar weniger intensiv. Auffallend war ferner, dass die Blutgerinnung beim behandelten Tier wesentlich schneller als beim unbehandelten Tier eintrat; die inneren Organe sahen im Vergleich zum unbehandelten Tier blutleer aus; vielleicht kommt es durch einen adrenalinverwandten Effekt zu einer intensiveren Durchblutung der Peripherie mit einer notwendigen Entspeicherung der Blutdepots. Hieraus resultiert womöglich der bei der Leber auffallende Gewichtsunterschied.

Der Überstand vom Ultra-Zentrifugat des Leberhomogenats war beim unbehandelten Tier klarer und intensiver gerötet, auch das Sediment war sichtbar stärker gefärbt.

Die weiteren Unterschiede sind den nachstehenden Daten zu entnehmen.

Gewicht der inneren Organe:

	<u>Leber (Lb.)</u>	<u>Nieren (Ni.)</u>	<u>Lungen (Lg.)</u>	<u>Hirn (Br.)</u>
unbehandelte Ratte (R_N)	7.5 g	1.1 g	1.9 g	1.6 g
mit LSD behandelte Ratte (R_{LSD})	6.0 g	1.1 g	2.2 g	1.6 g

Protein-Gehalt der Homogenate:

	<u>Leber</u>	<u>Nieren</u>	<u>Lungen</u>	<u>Gehirn</u>
Homog. R_N	32.4	24.8	12.6	28.8 mg/ml
Homog. R_{LSD}	34.2	24.8	14.5	32.4 mg/ml

	<u>Leber (R. Std. v. U. Z.)</u>	<u>Leber (Ü. Std. v. U. Z.)</u>
Ratte N	34.3 mg/ml	16.2 mg/ml
Ratte LSD	36.6 mg/ml	18.3 mg/ml

Bemerkenswert ist der höhere Eiweissgehalt in den Leberpräparaten des Versuchstieres, der sowohl im Überstehenden und im Rückstand des Ultrazentrifugats wie im Homogenat selbst registriert wird, obwohl das Gewicht des Organs gegenüber dem Normaltier geringer ist.

TABELLE 13: Die Beeinflussung der MO-Aktivität durch Lysergsäure-Diäthylamid (LSD) bei in-vivo- und in-vitro-Versuchen mit Präparaten aus Ratten-Organen.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	spezifische Aktivität	
		O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol
Homog. Lb.R. _N	32.4	0.122	0.148
Homog. Lb.R. _{LSD}	34.2	0.138	0.216
Homog. Lb.R. _{N-LSD}	32.4	0.223	0.125
R.Std. v.U.Z. Lb.R. _N	34.3	0.148	0.231
dto. Lb.R. _{LSD}	36.6	0.224	0.201
dto. Lb.R. _{N-LSD}	34.3	0.187	0.140
Ü.Std. v.U.Z. Lb.R. _N	16.2	0.032	0.037
dto. Lb.R. _{LSD}	18.3	0.010	0.074
dto. Lb.R. _{N-LSD}	16.2	0.009	0.092

Erläuterungen:

Lb.R. = Leber Ratte; N = Normaltier (unbehandelt);
LSD = mit LSD in vivo behandelt;
N-LSD = LSD wurde in vitro hinzugefügt, in einer 10⁻⁴ m Endkonzentration.

Die Versuchsdauer betrug jeweils 40 Minuten;
als Substrat wurde Tryptamin zugegeben.

R.Std. v.U.Z. = Sediment vom Ultrazentrifugat;

Ü.Std. v.U.Z. = Überstand vom Ultrazentrifugat.

Fortsetzung der TABELLE 13:

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	spezifische Aktivität	
		O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol
Homog. Ni.R _N	24.8	0.046	xxx
Homog. Ni.R _{LSD}	24.8	0.062	0.088
Homog. Lg.R _N	12.6	0.056	0.333
Homog. Lg.R _{LSD}	14.5	0.067	0.206
Homog. Br.R _N	28.8	0.036	0.089
Homog. Br.R _{LSD}	32.4	(* / 0.025)	0.056

Erläuterungen:

Ni.R. = Nieren Ratte;

Lg.R. = Lungen Ratte;

Br.R. = Gehirn Ratte; sonst wie vor.

Die in vitro-Versuche konnten bei diesen Organen aus versuchstechnischen Gründen (zu wenig Material) nicht durchgeführt werden.

TABELLE 14: Die Beeinflussung der MO-Aktivität bei Präparaten aus Schweine-Nieren und Schweine-Leber durch Hinzufügen von:
 Lysergsäure-Diäthylamid (LSD);
 Bromlysergsäure-Diäthylamid (Br-LSD) und Mezcalin (Mzc);
 als Substrat wurde Tryptamin zugegeben;
 die Versuchsdauer betrug 40 Minuten.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	spezifische Aktivität		Aktivierung in % (+) Hemmung in % (-)	
		O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol	O ₂ -Verbr.	NH ₃ -Entw.
Homog. <u>Ni.S.</u>	42,6	0.310	0.260		
dto. u. LSD 10 ⁻⁴	42,6	0.382	0.229	+ 23.2	- 12,0
dto. u. LSD 2 x 10 ⁻⁴	42,6	0.444	0.255	+ 43.3	- 2,0
dto. u. Br-LSD 10 ⁻⁴	42,6	0.305	0.190	- 1.6	- 22,0
dto. u. Mzc 10 ⁻²	45,8	0.351	0.275	+ 13.1	+ 6,0
Homog. <u>Lb.S.</u> u. Kin.	37,5	0.504	0.571		
R. Std. v. Z.					
dto.	21,1	0.606	0.413		
dto. u. LSD 3 x 10 ⁻⁴	37,5	0.448	0.668	- 11.2	+ 17,0
dto. u. Br-LSD 3 x 10 ⁻⁴	37,5	0.650	0.609	+ 29.0	+ 6,7
dto. u. Mzc 10 ⁻²	21,1	0.630	0.491	+ 4.0	+ 18,9

Gereinigte DO aus Erbsen wird nach den Angaben von D. AURES durch 10⁻⁵m LSD zu 10 %, durch 10⁻⁴m LSD zu 21 % und durch Br-LSD in 10⁻⁴molarer Konzentration zu 11 % gehemmt (31).

Die angestellten Versuche lassen somit Folgendes erkennen:

Das mit LSD behandelte Versuchstier (Albino-Ratte) machte einen introvertierten Eindruck, wobei alle Sinnesempfindungen übersteigert erschienen. Es resultierte eine gewisse Lichtscheue, Hypersensibilität der Haut und der Gehörorgane mit dem Bestreben, sich scheu zurückzuziehen.

Bei den in-vivo-Versuchen war die MO-Aktivität bei Leber-, Nieren- und Lungen-Mitochondrien gesteigert. Im Gegensatz dazu war die Monaminoxidase der Präparate des Gehirns unter der Einwirkung von LSD stark gehemmt. Allerdings müssten diese Versuche wiederholt werden, um beweisend zu sein.

Die in-vitro-Versuche sind nicht ohne weiteres mit den in-vivo-Versuchen vergleichbar. Es zeigen sich vor allem wesentliche Unterschiede in quantitativer Hinsicht und bezüglich der NH_3 -Entwicklung.

Aus der Gegenüberstellung von: Homogenat, Überstand und Suspension des Rückstandes vom Ultrazentrifugat bei den Leberpräparaten geht hervor, dass eine komplizierte gegenseitige Beeinflussung von DO und MO bestehen muss. Die löslichen Fermentbestandteile im Überstehenden werden durch LSD im negativen Sinne beeinflusst, was mit den Beobachtungen von D. AURES an gereinigter DO aus Erbsen übereinstimmt. Dieses Verhalten ist nicht ohne Rückwirkung auf das Homogenat, das sowohl gelöste wie ungelöste Aminoxydasen enthält.

Wie die ergänzenden in-vitro-Versuche mit Nieren- und Leberpräparaten vom Schwein zeigen, wird mit Bromlysergsäure-Diäthylamid keineswegs der gleiche Effekt erzielt. Vielmehr wird bei der Niere anstelle des vermehrten O_2 -Verbrauches durch LSD ein verminderter O_2 -Bedarf durch Zufügen von Br-LSD kenntlich; bei der Leber dagegen übt Br-LSD einen aktivierenden Einfluss aus.

Mezcalin scheint gegenüber LSD nur einen graduellen Unterschied in seiner Wirkung auf das Fermentsystem der MO aufzuweisen.

Der oxydative Abbau von Tryptamin in den Zellen wird also durch die geprüften halluzinogenen Stoffe merklich verändert; und zwar im Gehirn im negativen und in der Leber im positiven Sinne.

Das Verhalten des Tieres weist auf eine Anregung des Sympathikus wie auch des Parasympathikus hin. Es handelt sich also um einen wichtigen Eingriff in das vegetative Geschehen, womit sich auch das geschilderte antagonistische Verhalten der Organpräparate erklären liesse.

6) ZUR FRAGE DER LÖSLICHKEIT DER MONAMINOXYDASE

Verschiedene Versuche, die an Mitochondrien gebundene Monaminoxidase durch mechanische oder chemische Massnahmen in Lösung zu bringen, haben bisher nicht die gewünschten Erfolge gebracht (27).

Durch oberflächenaktive Substanzen konnte zwar eine Löslichkeitssteigerung erreicht werden. E. HENNIG erzielte z. B. durch Behandlung mit Polyglykoläthern bei Schweineleber-Homogenaten eine Löslichkeitssteigerung um 60 bis 80 % (11). Die Angaben in der erwähnten Arbeit beziehen sich aber nur auf Partikel, die bei einer Sedimentationsbeschleunigung von $18\,000 \times g$ nicht niedergeschlagen werden. Der Begriff "Erhöhung der Löslichkeit" ist also wohl nur bedingt richtig.

Das Problem wurde deshalb von uns nochmals aufgegriffen. Versuche, mit Kaliumrhodanid eine lösliche Form der MO zu erhalten, führte uns dem gewünschten Ziel nicht näher. Zwar konnte im Überstehenden des Zentrifugats bei $18\,000 \times g$ eine deutlich gesteigerte MO-Aktivität beobachtet werden. Nach scharfem Zentrifugieren bei $78\,400 \times g$ war das Überstehende aber wieder klar und zeigte keine Aktivität. Somit ist höchstens anzunehmen, dass Rhodanid evtl. durch seine proteinquellende Wirkung von einem Teil der Mitochondrien eine kleinere Form - Grana bzw. Promitochondrien - abzutrennen vermag, die eine relative Stabilisierung ihrer Suspension bewirkt. Von einer echten Steigerung der Löslichkeit kann jedoch nicht gesprochen werden.

Ferner wurde versucht, durch Zufügen von Hyaluronidase ("Kinetin" der Firma Schering) eine bessere Löslichkeit zu erzielen.

Es wurden 100 ml Schweineleber-Homogenat (1 : 3) mit 600 I.E. "Kinetin" (in 8 ml 0,9 % NaCl-Lsg. gelöst) vermischt, zwei mal 5 Std. (mit zwischenzeitlicher 15-stündiger Aufbewahrung im Eisschrank) bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschliessend bei $18\,000 \times g$ 45 Min. bei 0°C zentrifugiert. Das Überstehende wurde durch Abgiessen vom Bodensatz getrennt, der so erhaltene Rückstand wurde mit 30 ml PO_4 -Puffer, pH 7,4, im Mörser gut aufgerührt (Eisbad), und sowohl Überstand wie Rückstand nach den Standardbedingungen auf ihre Aktivität geprüft. Beide Präparate zeigten einen hohen endogenen Sauerstoffverbrauch (hohe Leerwerte).

Das Überstehende wurde daraufhin nochmals wie zuvor zentrifugiert (Z_2) und der Niederschlag wiederum mit 30 ml Puffer aufgerührt. Da auch dieser Überstand eine deutliche Aktivität zeigte, wurde nochmals in der gleichen Weise verfahren (Z_3), allerdings wurden dem Bodensatz nunmehr nur 15 ml Puffer zugesetzt. Dieses dreimalige Zentrifugieren bei $18\,000 \times g$ genügte nicht, um einen vollständig klaren Überstand zu erhalten. Erst das Ultrazentrifugat (60 Min. bei $78\,400 \times g$) zeigte eine klare, durchsichtige, rot-bräunlich gefärbte obere Schicht mit minimaler Aktivität; dicht über dem kompakten Rückstand konnte eine leicht trübe Flüssigkeit (M. Std.) aufgefangen werden, die unverdünnt den Prüfungs-Ansätzen zugefügt wurde. Die Bearbeitung des Sediments erfolgte in der zuvor beschriebenen Weise.

Die nachfolgende Tabelle stellt die Mittelwerte der Prüfungsergebnisse aus jeweils 4 bzw. 2 Parallel-Ansätzen gegenüber.

TABELLE 15: Die Einwirkung von Hyaluronidase auf Schweine-Leber-Präparate.

Fermentpräparat:	Protein: mg/ml	Substrat: End-Konz. 10 ⁻²	spezifische Aktivität	
			O ₂ -Verbr. μ Mol/2	NH ₃ -Entw. μ Mol
Homog. <u>Lb. S.</u> (1 : 4)	30.4	Tyramin	0.730	0.830
dto. u. <u>Kin.</u>	37.5	Tryptamin	0.865	0.694 +
<u>Lb. S. u. Kin.</u>				
R. Std. v. Z ₂	25.4	Tryptamin	0.873	0.653
dto.				
R. Std. v. Z ₃	16.7	Tryptamin	0.826	0.870
dto.				
R. Std. v. U. Z.	54.4	Tryptamin	0.840	0.794
dto.				
Ü. Std. v. Z ₃	63.0	Tryptamin	0.477	0.417
dto.				
M. Std. v. U. Z.	56.0	Tryptamin	0.164	0.165
dto.				
Ü. Std. v. U. Z.	33.0	Tryptamin	0.033	0.032

Erläuterungen:

- Lb. S. = Leber Schwein;
 Kin. = "Kinetin" = Hyaluronidasê der Firma Schering A.G., Berlin;
 R. Std. = Sediment
 v. Z_{2,3} = vom 2. bzw. 3. Zentrifugat,
 v. U. Z. = vom Ultrazentrifugat (hierzu siehe Text!),
 Ü. Std. = Überstand vom jeweiligen Zentrifugat,
 M. Std. = mittlere Schicht vom Ultrazentrifugat.

+ Die Versuchsdauer betrug 60 Minuten,
 bei allen übrigen Versuchen 40 Minuten.

Die Werte lassen erkennen, dass durch Einwirkung von Hyaluronidase beim O_2 -Verbrauch eine Steigerung von ca. 16 % erreicht wird. Diese Aktivitätssteigerung wird schon im unzentrifugierten Homogenat beobachtet und lässt sich durch häufigeres und schärferes Zentrifugieren scheinbar nicht verändern. Die etwas abweichenden NH_3 -Werte sind vermutlich der unterschiedlichen Versuchsdauer und Fermentkonzentration zuzuschreiben (siehe Abs. B 5). Der Eiweissgehalt der Überstände ist verhältnismässig hoch, so dass mit einer teilweisen Membranlösung der Mitochondrien durch Hyaluronidase zu rechnen ist. Dafür spricht auch die unterschiedliche Aktivität in den einzelnen Überständen. Es ist vorstellbar, dass verschiedene grosse Mitochondrien frei gesetzt werden, die dann entsprechend ihrer Schwere bei unterschiedlichen Beschleunigungen sedimentieren. Auffallend und bemerkenswert ist, dass die Mitochondrien aus den Rückständen der verschiedenen Zentrifugate fast gleiche Aktivität zeigen. Die Funktion der MO scheint somit nicht so sehr von der Grösse der einzelnen Mitochondrien wie von ihrer inneren Struktur abhängig zu sein, die entsprechend den früheren Ausführungen (Abs. C 1) vermutlich streng artspezifisch ist.

Diese wirkliche "spezifische" Aktivität wurde von der Hyaluronidase nicht beeinflusst. Eine Steigerung der Löslichkeit des Fermentes wurde auch auf diesem Wege nicht erreicht.

Da eine Hyaluronidase in verschiedenen Schlangengiften nachgewiesen werden konnte (DURAN-REYNALD, 1936), liegt die Vermutung nahe, dass die in der Literatur angegebenen gelungenen Löslichkeitsversuche mit Schlangengift u.ä. teilweise auf diesen Faktor zurückzuführen sind. Daneben kommt wahrscheinlich auch der Lecithinase A, die in Schlangengiften, Bienen- und Skorpiongiften festgestellt wurde, eine besondere Bedeutung zu. Dieses Ferment kann z.B. aus dem Lecithin ein Molekül Fettsäure frei machen, wodurch Lysocytion entsteht, das seinerseits die Membran der Erythrozyten angreift, so dass es Hämolyse der roten Blutkörperchen bewirkt.

Hier sei erwähnt, dass der MO lipophile Eigenschaften zugesprochen werden, und dass sich nach Beobachtungen von COTZIAS dieses Enzym an Grenzschichten zwischen Olivenöl und Wasser anreichert (11).

So wurden noch In-vitro-Versuche mit "Pankreatin" (der Firma Dr. W. Schwabe) angeschlossen, das neben einer Amylase vor allem Proteinasen enthält, die im neutralen bzw. leicht alkalischen Milieu besonders wirksam sind. Ausserdem muss der im Pankreatin vorhandenen Lipase eine grosse Bedeutung zukommen, die im gleichen p_H -Bereich ihr Optimum besitzt.

Das Ultrazentrifugat der mit Pankreatin versetzten Leber-Homogenate zeigte eine deutliche Abtrennung von Fettropfen in der obersten Schicht, auch war das Überstehende nicht vollständig klar. Eine MO-Aktivität war in diesen leicht trüben Überständen feststellbar; aber die Vergleichswerte waren zu ungenau, um endgültige Aussagen machen zu können. Vermutlich liegen beim "Pankreatin" Verun-

reinigungen vor, die zunächst ausgeschaltet werden müssten, um einwandfreie Vergleichswerte zu erhalten.

D. DISKUSSION

Bei der Monaminoxidase konnte neben einer Art- auch eine Organ-spezifität eindeutig festgestellt werden. Es liegt vermutlich eine vererbare "Individualität" des Eiweissmoleküls vor, die neben der festliegenden Art-Spezifität eine gleichfalls vererbare Rassenspezifität zulässt. Daneben ist eine weitere vorgeschriebene Eigenart denkbar, die die individuelle Persönlichkeit bei allen Lebewesen ausmacht. Die Variationsmöglichkeiten bewegen sich dabei je nach Tierart wahrscheinlich in ganz bestimmten Grenzen. Hier sei auch auf die Ausführungen von O. BAYER (2) verwiesen.

Bei allen Versuchen zur Charakterisierung der Aminooxydasen muss folglich die jeweilige Art-Spezifität mit berücksichtigt werden. Nach eigenen Beobachtungen und Literaturangaben liegt die MO-Aktivität beim Menschen im Vergleich mit den gleichen Organen von Tieren im allgemeinen verhältnismässig hoch (25, 30).

Es ist anzunehmen, dass sich die Organ-Spezifität aus einem notwendigen strengen Prinzip der Arbeitsteilung bei höher entwickelten Organismen ergeben hat; sie ist für uns von besonderem Interesse, da alle pathologischen Erscheinungen durch ein nicht harmonisches Zusammenwirken der Körperfunktionen bedingt sind. Dabei spielen Ausfälle und Überfunktionen von Enzymen eine wichtige Rolle.

Auffallend ist bei der Gegenüberstellung der MO-Aktivitäten verschiedener Organe derselben Tierart die andere "Niveau-Einstellung" in den ersten 10 bzw. 12 Minuten. Damit ist die Feststellung gemeint, dass z. B. bei Pankreas- und Gl. Submaxillaris-Präparaten nach dem Einkippen des Substrates der Sauerstoff-Verbrauch verzögert einsetzt gegenüber einer intensiven Anfangs-Aktivität bei Leber-Präparaten. Dabei spielen womöglich Ausscheidungsprodukte der drüsigen Organe oder der Mitochondrien selbst eine Rolle. So konnte R. DANNEEL (8) bei seinen Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop kleine Sekretkugeln erkennen, die bei Pankreasschnitten den Mitochondrien anliegen. Gerade bei diesem Organ machten unsere Versuche eine beachtliche Änderung in der "Niveau-Einstellung" deutlich (siehe Abb. 3/4). Auch die negative Beeinflussung der MO-Aktivität durch Speichelbeimengungen (Tabelle 3) mag in diesem Zusammenhang erwähnt werden. Die früher ausgesprochene Vermutung, dass durch mehrfaches Extrahieren und Zentrifugieren der Organ-Homogenate u. U. ein Hemmkörper abgetrennt wird, lässt sich mit der entwickelten Vorstellung gut vereinbaren. Wahrscheinlich spielt bei der Einstellung des Fermentsystems ausserdem die Beschaffenheit der Mitochondrien-Hülle selbst eine ausschlaggebende Rolle. Auch muss der Einfluss von pH -Wertverschiebungen durch die Sekrete mit berücksichtigt werden.

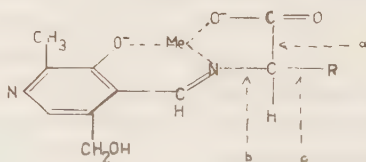
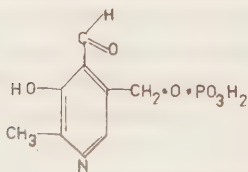
So lassen sich bereits in den Mitochondrien selbst und in ihrer engsten Umgebung verschiedene Faktoren erkennen, die die MO-Aktivität massgebend beeinflussen.

Entgegen diesen inaktivierenden Beimengungen liess sich aus der Leber ein Extrakt mit deutlich aktivitätssteigernder Wirkung herstellen. Dabei kann an die Auswirkung einer Transaminase wie unter C 2 angegeben gedacht werden.

Durch Zufügen von Pyridoxalphosphat wurde jedoch keine direkte Aktivierung des Fermentes erreicht. Trotzdem ist wahrscheinlich Pyridoxalphosphat indirekt massgebend an der festgestellten aktivitätssteigernden Wirkung beteiligt. Der negative Effekt bei unseren Versuchen kann durch die Unstabilität des Pyridoxals in Gegenwart von oxydierenden Mitteln vorgetauscht sein. Dem gegenüber ist aber einerseits die Bildung von Eigensubstrat über den Weg einer gesteigerten Aminosäure-Decarboxylase denkbar, die im positiven Sinne in den Prozess eingreifen kann; andererseits wird u.U. die Permeabilität der Membran verändert, so dass die geschilderte Abtrennung verschiedener Teilchengrössen möglich wird (vergleiche S. 26).

Die Wichtigkeit des Co-Faktors Pyridoxalphosphat im Regulationsmechanismus der fermentativen Vorgänge, geht ausserdem aus der entgegengesetzten Einwirkung auf die MO-Aktivität der Uterus-Mitochondrien hervor. Hieraus kann das Eingreifen in den Steroidstoffwechsel abgeleitet werden, auf die Beziehung zwischen Vitamin E und Vitamin B₆ im Fettstoffwechsel sei hingewiesen.

Betrachten wir die Strukturformel des Pyridoxalphosphats, so wird seine Coferment-Wirkung nach verschiedenen Richtungen wie Decarboxylase, Transaminase Kondensation des Serins mit dem Indol zu Tryptophan usw. vorstellbar. In Gegenwart von Metallsalzen (Cu^{++} , Fe^{++} , Al^{+++}) lassen sich diese Reaktionen auch in vitro auf nicht enzymatischem Weg durchführen. Zur Erklärung nehmen METZLER, SNELL und Mitarb. eine Chelatbildung zwischen Metallion, Pyridoxal und Aminosäure an:



Pyridoxal-5-phosphat

Chelatbildung

Spaltung bei a würde z.B. Decarboxylierung der Aminosäure bedeuten; hydrolytische Spaltung bei b würde zur Transaminierung führen; durch Spaltung bei c könnte z.B. aus Serin das Glycocoll entstehen, usw. (18).

Welche Richtung der Reaktionsmechanismus bei den enzymatischen Umsetzungen nimmt, wird vermutlich durch die Natur der Aminosäure und des Fermentproteins bestimmt. In welcher Weise die Art des Metallions den reaktionsfähigen Komplex beeinflusst, konnte bisher nicht endgültig ermittelt werden.

Aus den Versuchen mit aromatisch hydroxylierten Substraten ergibt sich eine klare Verschiedenheit der relativen Substratspezifität der MO verschiedener Organe. So wird durch die MO von Leber, Nieren, Kleinhirn und Placenta und gemäss Literaturberichten auch bei foetalen Geweben Tryptamin am raschesten abgebaut, es folgt Tyramin mit fast ähnlich guten Ergebnissen. Dagegen zeigten sich die Indol-Abkömmlinge für Uterus, Hirnstamm und Rückenmark als Substrate weniger geeignet als Tyramin und Dopamin. β -Phenyl-Äthylamin setzte die MO-Aktivität bei beiden Organgruppen stark herab.

Wir haben somit zwei Wirkungskreise - die Beschaffenheit des Fermentsystems und die Eigenart des Substrates - die auf einander gut abgestimmt sein müssen, um eine optimale Wirksamkeit zu erhalten.

Dieser feinabgestufte Reaktionsmechanismus der oxydativen Desaminierungsvorgänge liess auch an die gegenseitige Beeinflussung von DO und MO denken, die tatsächlich in vitro demonstriert werden konnte. Dabei scheint nach unseren Versuchen Histamin im Gegensatz zu Cadaverin und Spermidin die MO-Aktivität eher zu hemmen als zu begünstigen. Eine zusätzliche Steuerung des Systems durch das Vorliegen einer Histaminase wird damit bedeutungsvoll. Nach Mitteilung von KAPPELLER-ADLER erhöhen die natürlich vorkommenden Steroidhormone (Oestradiol, Oestron, Oestrol und Equilin) die Histaminaseaktivität gegenüber Histamin und setzen sie gegenüber Cadaverin herab. Die gonadotropen Hormone dagegen hemmen den enzymatischen Abbau des Histamins und fördern den des Cadaverins. Wenn wir annehmen, dass die Histaminase ein beachtenswertes Zwischenglied neben der löslichen DO und weitgehend unlöslichen MO darstellt, würden die vorgenannten Angaben bedeuten, dass die erwähnten Steroidhormone das Gleichgewicht mehr in Richtung MO-Aktivität verschieben, die gonadotropen Hormone mehr die Tätigkeit der DO begünstigen. Dem Histamin scheint demnach eine wichtige Schlüsselstellung bei allen Wachstumsprozessen zuzukommen, wie auch aus den Mitteilungen von G. KAHLSON und Mitarb. (15) hervorgeht (16, 9, 28).

Nach dem bisher Gesagten schien es für uns von besonderem Interesse zu ermitteln, in welcher Weise Lysergsäurediäthylamid in die fermentativen Vorgänge eingreift. Von dieser Substanz ist seit langem ein psychogener und uterogener Effekt bekannt. Wir konnten aus unseren In-vivo- und In-vitro-Versuchen folgern, dass die oxydativen Prozesse durch LSD eine einschneidende Änderung erfahren. Mehr O_2 -Verbrauch wird vor allem bei Leber- und Nieren-Präparaten beobachtet. Die oxydativen Prozesse im Gehirn erfahren dagegen eine starke Drosselung. Es ist vorstellbar, dass durch LSD der Serotonin-Mechanismus gestört wird, so dass seine Wirkung als Antioxydans nicht zur Entfaltung kommen kann. Die Entstehung "toxi-

scher" Psychosen ist durch die gestörte Stoffwechsellage durchaus vorstellbar. Dabei scheint die Stoffwechselsteigerung in den Leber- und Nieren-Mitochondrien dem erhöhten Bedürfnis eines schnelleren Abtransportes der "toxischen" Substanzen entgegenzukommen. Daneben kommt es in der Leber vermutlich zu einem vermehrten Glykogenumbau, der zur Aufrechterhaltung des Stoffwechselgleichgewichtes für den Körper notwendig wird.

Das mit LSD behandelte Versuchstier wies in Übereinstimmung mit diesen Messergebnissen die Anzeichen einer "toxischen Introversion" auf. Es muss sich folglich um ein spürbares Eingreifen in das neuro-vegetative Geschehen handeln, womit sich ebenfalls das antagonistische Verhalten der Organfunktionen erklären liesse.

Unsere Versuche zur Klärung der Löslichkeit der MO bestätigen die Annahme, dass es sich hier um ein Fermentsystem handeln muss, das in den einzelnen Organen und je nach Reifezustand unterschiedlich verankert ist. Je nach Wachstums- und Alterungsprozess ist die Beschaffenheit der Mitochondrien-Membran wahrscheinlich verschieden; ausserdem muss entsprechend elektronenoptischen Bildern zwischen einer äusseren und inneren Membran unterschieden werden, die sich im Aufbau und damit auch in ihrer Permeabilität verschieden verhalten.

Die Leber lässt auf Grund ihrer "spontanen Löslichkeit" an das Vorkommen verschieden gearteter Mitochondrien nebeneinander denken. Die starken Regenerationsprozesse in diesem Organ lassen an das gleichzeitige Vorhandensein unterschiedlicher Entwicklungsformen denken; ebenso die "leichte" Löslichkeit der Leber-Mitochondrien an eine teilweise Beeinflussung durch oberflächenspannungsverändernde Kräfte.

Mit Kaliumrhodanid und Hyaluronidase liess sich eine (unechte) Löslichkeitssteigerung erreichen, die MO-Aktivität blieb aber in ihren Grundzügen unbeeinflusst.

Die proteinquellende Wirkung des Rhodanids kann u.U. eine Aufteilung in kleinere Mitochondrien (Grana, Promitochondrien) bewirken, die die beobachtete Aktivitätssteigerung hervorrufen.

Bei Einwirkung der Hyaluronidase ist es denkbar, dass eine äussere Umhüllung gesprengt wird, die ebenfalls eine Aufteilung in kleinere Bestandteile bzw. in Mitochondrien-Knospen ermöglicht, ohne die innere Struktur des Fermentsystems zu beeinflussen.

Dem Pankreasferment scheint für die Löslichkeit eine besondere Bedeutung zuzukommen. Durch verschiedene Proteinasen werden bestimmte Peptidbindungen gespalten, die eine Veränderung der Konstellation des Proteinmoleküls bedingen und u.U. neue Angriffspunkte für die Fermenteinwirkung entstehen lassen. Von Wichtigkeit scheint dabei, dass Trypsin und Chymotrypsin auch eine schwache Aktivität gegenüber Fettsäureestern zeigen. Ausserdem muss der Pankreas-Lipase eine besondere Bedeutung zugemessen werden; denn beim fein differenzier-

ten Zusammenspiel des Fermentsystems in den Mitochondrien spielt die Anordnung von wasserlöslichen und Lipoprotein-Enzymen eine ausschlaggebende Bedeutung (11).

Die angestellten Versuche mit "Pankreatin" brachten leider keine einwandfreien, endgültigen Ergebnisse, d.h. es konnte keine sichere Erhöhung der MO-Löslichkeit durch "Pankreatin" erreicht werden. Weitere Experimente mit entsprechend gereinigten Pankreas-Ferment-Präparaten scheinen angezeigt.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Monaminoxidase liess sich durch Aktivitätsbestimmungen auf Grund der Gegenüberstellung von O_2 -Verbrauch und NH_3 -Entwicklung eine Organspezifität innerhalb der jeweiligen Artspezifität feststellen.

Die verschiedenen Organe zeigen vor allem eine unterschiedliche Anfangsaktivität, wofür wahrscheinlich Ausscheidungsprodukte der drüsigen Organe bzw. der Mitochondrien selbst verantwortlich zu machen sind. So wurde durch Speichelbeimengungen die MO-Aktivität gehemmt, dagegen zeigte ein selbst hergestellter Leber-Extrakt eine deutliche aktivitätssteigernde Wirkung.

Hinzufügen von Pyridoxalphosphat liess keine eindeutige Aktivierung des Fermentes erkennen; es scheint aber für den Regulationsmechanismus der fermentativen Vorgänge von Wichtigkeit zu sein. So zeigten die In-vitro-Versuche bei der Leber zunächst eine verminderte dagegen beim Uterus eine gesteigerte MO-Aktivität.

Aus Versuchen mit aromatischen mono-, di-hydroxylierten und nicht hydroxylierten Substraten geht ein grundsätzlich anderes Verhalten von Uterus, Hirnstamm und Rückenmark einerseits und Leber, Nieren, Kleinhirn und Placenta andererseits hervor. Für die letztgenannte Gruppe erwiesen sich Tryptamin und Tyramin als besonders gut geeignete Substrate. Dagegen wurden von Uterus, Hirnstamm und Rückenmark die Benzolabkömmlinge: Tyramin und Dopamin bevorzugt.

Eine gewisse Parallelität des Verhaltens der Monaminoxidase von Uterus und Hirnstamm lassen auch die Experimente mit Lysergsäurediäthylamid erkennen. In-vivo- und In-vitro-Versuche gaben Berechtigung zu der Annahme, dass durch LSD eine Blockierung des Serotonin-Mechanismus im Gehirn erfolgt. Das Vegetativum des Versuchstieres war deutlich verändert. Diese Substanz beeinflusst somit vor allem das neuro-vegetative Geschehen. Weitere In-vitro-Versuche mit Mezcalin ergaben nur einen graduellen Unterschied gegenüber LSD.

Auf die gegenseitige Beeinflussung von DO und MO wurde hingewiesen. Dabei ergaben die Versuche eine Sonderstellung der Histaminase, dieses Ferment scheint den Steuerungsmechanismus von DO- und MO-Aktivität zu beeinflus-

sen und hat damit bei allen Reife- und Wachstumsprozessen eine besondere Bedeutung.

Auf Grund von Löslichkeitsversuchen müssen bei den Mitochondrien, die das Fermentsystem der MO enthalten, unterschiedliche Membranstrukturen angenommen werden. Durch Einwirkung von Kaliumrhodanid und Hyaluronidase lassen sich vermutlich kleinere Bestandteile wie Promitochondrien bzw. Mitochondrienknospen abtrennen, die eine "Löslichkeitssteigerung" bewirken. Die innere Struktur des Fermentsystems, das "aktive Zentrum", bleibt aber unbeeinflusst. Ob und in wie weit durch Pankreasfermente in das System eingegriffen werden kann, liess sich nicht exakt genug ermitteln, da Pankreas-Proteasen und Lipase in genügend reiner Form nicht zur Verfügung standen.

LITERATURVERZEICHNIS

- (1) AURES, D.: Zur Biosynthese des Adrenalins. Reinigung und Spezifität der 3,4-Dihydroxyphenylalanin-Decarboxylase. Dissertation (Mü., Juni 1959)

- WERLE, E. und AURES, D.: Über die Reinigung und Spezifität der DOPA- Decarboxylase. Hoppe-Seyler's Z.f.physiol. Chemie 316, 45-60 (1959)

- (2) BAYER, O.: Zur Entwicklung und Problematik des organischen Makromoleküls. Angewandte Chemie, 4 (1959)

- (3) BENDA, C.: Die Mitochondria. Ergebn. Anat. 12, 743 (1902)

- (4) BLASCHKO, H. und CHRUSCIEL, T.L.: J. Physiol. (Lond.) 151, 272 (1960)

- (5) BRÜCKE, F.v.: Die Beurteilung zentraler Wirkungen von Pharmaka mit Hilfe des EEG. Klin. Wochschr. 10, 567 (1959)

- (6) BURKHARD, W.P., GEY, K.F. und PLETSCHER, A.: Inhibition of Diamine Oxidase "in vivo" by Hydrazine Derivatives. Biochem. Pharmac. 3, 249-55 (1960)

- (7) COTZIAS, G.C. und GREENOUGH, J.J.: Quantitative estimation of amineoxidase. Nature (Lond.) 183, 1732-1733 (1959)

- (8) DANNEEL, R.: Entstehung, Funktion und Feinbau der Mitochondrien. Arbeitsgemeinschaft für Forschung d. Landes Nordrhein-Westfalen, Heft 79 (2.IV.58)

- (9) DIXON, J.B.: Histamin, 5-Hydroxytryptamin u. Serumglobuline in der fetalen u. neugeborenen Ratte. J. Physiol. (Lond.) 147, 144-152 (1959)

- (10) GREEN, D.E.: The cyclophorase complex of enzymes. Biol. Rev. 26, 410 (1951)

- (11) HENNIG, E.: Eigenschaften von Monaminoxidase aus Schweineorganen nach der Behandlung mit Aryl- und Alkylpolyglykolythern.
Dissertation (München 1960)
- (12) HOLTZ, P., BALZER, H., WESTERMANN, E. u. WETZLER, E.: Beeinflussung der Evipanarkose durch Reserpin, Iproniazid u. biogene Amine.
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 231, 333-348 (1957)
- (13) HORITA, A. u. McGRATH, W. R.: Über spezifische Leber- und Hirn-Monaminoxidase-Hemmung der Alkyl- und Arylalkylhydrazine.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 103, 753 (1960)
- (14) JUNG, R.: Zentrale Wirkungsmechanismen chemischer Substanzen und ihre neurophysiologischen Grundlagen.
Klinische Wo.-Schrift, Heft 24 (1958)
- (15) KAHLSON, G., ROSENGREN, E. u. WHITE, T.: Die Bildung von Histamin im Rattenfoetus.
J. Physiol. (Lond.) 151, 131 (1960)
- (16) KAPPELLER u. ADLER, R.: Biochem. J. 44, 70 (1949), 48, 99 (1951), 51, 21 (1952)
- (17) LABORIT, H., NIAUSSAT, P., BROUSOLLE, B., JOUANY, J. M.: Discussion de faits expérimentaux amenant à proposer une signification biologique nouvelle de la sérotonine.
Med. exp. (Basel) 1, 78-84 (1959)
- (18) LEUTHARD, F.: Lehrbuch der Physiologischen Chemie, 14. Auflage (1959)
- (19) LEVY, J. u. MICHEL-BER, E.: Hypothese über die Wirkungsmechanismen der MO-Hemmer auf das Zentralnervensystem.
C. R. Acad. Sci. (Paris) 250, 415 (1960)
- (20) MANN, P. J. G.: Purification and Properties of the Amine Oxidase of Pea Seedlings.
Bioch. Journ. 59 (1955)
- (21) RAUEN, H. M.: Biochemisches Taschenbuch, Springer-Verlag (1956)

- (22) ROEWER, F. u. WERLE, E.:
Verhinderung der Isopropyl-Isonicotin-Sre.-Hydrazid
(Iproniazid-Marsilid)-Hemmung der Monaminoxydase
durch Blut in vitro.
Arch. exper. Path. u. Pharmakol. 230, 552 (1957)
- (23) ROSENFELD, G.: Inhibitory influence of ethanol on serotonin metabolism.
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 103, 144-149 (1960)
- (24) SHORE, P. A., MEAD, J. A. R., KUNTZMAN, R. G., SPECTOR, S. u.
BRODIE, B. B.:
On the physiologic-significance of monoamine oxidase
in brain.
Science (Lancaster, Pa.) 126, 1063-1064 (1957)
- (25) STRÖMBLAD, B. C. R.: Observations on Amine Oxidase in Human Salivary
Glands.
J. Physiol. (Lond.) 147, 639-643 (59)
- (26) WARBURG, O.: Über sauerstoffatmende Körnchen aus Leberzellen und
über Sauerstoffatmung in Berkefeld-Filtraten wässriger
Leberextrakte.
Pflügers Arch. 154, 599 (1913)

Über die Entstehung der Krebszellen.
Naturw. 42, 401 (1955)
- (27) WERLE, E. u. HENNIG, E.:
Einwirkung von Aryl- und Alkylpolyglykoläthern auf
Monaminoxydase aus Schweineleber und über den Mon-
und Diaminoxydasegehalt der Nieren von Foeten und
ausgewachsenen Tieren.
Z. f. Vit., Horm. u. Ferm.-Forsch. 11, 159 (1960)
- (28) WOOLEY, D. W.: Exploration of the interrelationship of Serotonin with
the Epinephrines and Histamine.
Proc. of the National Acad. of Sci. 46, 7 (1960)
- (29) ZELLER, E. A., BARSKY, J., BERMAN, E. R., CERJAD, M. S. u. FOUTS, J. R.:
J. Pharmacol. exp. Ther. 12, 282 (1958)
- (30) ZELLER, E. A.: Vortrag gehalten am Institut für Physiologie.
München, am 11. Juli 1960.
- (31) WERLE, E. u. AURES, D.:
persönliche Mitteilungen, unveröffentlicht (1960)

Herrn Professor Dr. Dr. E. WERLE danke ich für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes und des Themas. Zugleich möchte ich für die mannigfache Hilfe und Unterstützung, die mir während der Durchführung der vorliegenden Arbeit gewährt wurden, meinen herzlichsten Dank sagen.

LEBENS LAUF

Am 10. Mai 1920 wurde ich als drittes Kind des Schlossers Hermann Husemann und seiner Ehefrau Johanne, geb. Ellerbeck, in Bielefeld geboren.

Dort besuchte ich vier Jahre die Grundschule und anschliessend von Ostern 1930 bis Ostern 1936 die Cecilienschule (Städt. Oberlyzeum mit Frauenschule) und erhielt die Obersekundareife.

Nach meiner Ausbildung mit anschliessend praktischer Tätigkeit als Krankengymnastin versuchte ich nach Kriegsschluss, mich ganz der Medizin zuzuwenden. Von Januar 1946 bis Februar 1947 besuchte ich die Oberschule für Jungen in Traunstein (Obb.) und erhielt das Reifezeugnis.

1949 begann ich mit dem Medizin-Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und legte dort im Herbst 1955 das Staatsexamen ab. Die Bestallung als Arzt wurde mir am 21. Dezember 1955 erteilt.

Anschliessend war ich an Krankenhäusern in Traunstein, Bielefeld und Enger (Westf.) als Pflichtassistentin bzw. Assistenzärztin tätig. Von Januar 1960 bis Frühjahr 1961 arbeitete ich unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Werle am Klinisch-Chemischen Institut der Chirurgischen Universitätsklinik in München und führte die Versuche für die vorliegende Arbeit durch.

Seit März 1961 bin ich an der Orthopädischen Kinder-Klinik in Aschau/Chiemgau tätig.

